

ANTUNES ROMEU LIMA DO NASCIMENTO

DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS AO FEIJÃO-  
FAVA NO SEMIÁRIDO

Serra Talhada-PE

2014

ANTUNES ROMEU LIMA DO NASCIMENTO

DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS AO FEIJÃO-  
FAVA NO SEMIÁRIDO

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carolina Etienne Rosália e Silva Santos

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Dolores Santiago de Freitas

Serra Talhada-PE

2014

#### FICHA CATALOGRÁFICA

N244d Nascimento, Antunes Romeu Lima do  
Diversidade e caracterização de rizóbios associados ao  
feijão-fava no Semiárido./ Antunes Romeu Lima do Nascimento .  
– 2014.  
53 f.: il.

Orientadora: Carolina Etienne Rosália e Silva Santos.  
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra  
Talhada, Serra Talhada, 2014.  
Inclui referências, apêndice.

1. *Phaseolus lunatus*. 2. Nitrogênio - Fixação biológica. 3.  
Caracterização morfofisiológica. I. Santos, Carolina Etienne Rosália  
e Silva, orientadora. II. Freitas, Ana Dolores Santiago de, Co-  
Orientadora. III. Título

CDD 631

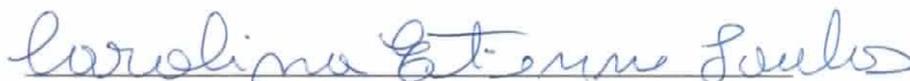
ANTUNES ROMEU LIMA DO NASCIMENTO

DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS AO FEIJÃO-  
FAVA NO SEMIÁRIDO

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

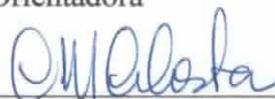
APROVADO em 24/02/2014.

Banca Examinadora



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

Orientadora



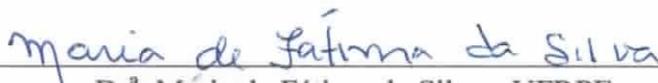
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cynthia Maria Carneiro Costa – UAST/UFRPE

Examinadora Interna



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rossana Barbosa Pragana – UAST/UFRPE

Examinadora Interna



Dr.<sup>a</sup>. Maria de Fátima da Silva - UFRPE

Examinadora Externa

Aos meus familiares e meus amigos pelo apoio e incentivo. A todos os agricultores, professores e pessoas que cruzaram meus caminhos e contribuíram com um pouco de sua sabedoria.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES pela concessão da bolsa REUNI.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao programa de Pós-graduação de Produção Vegetal da UAST pela oportunidade de cursar o Mestrado.

Aos amigos que fiz durante esta jornada de dois anos na UAST. Com destaque aos outros mestrandos do PGPV.

A Marisângela pela ajuda sempre que possível nas várias etapas do projeto e debates científicos.

Aos membros da banca examinadora pelas suas valiosas contribuições e sugestões.

A professora Carolina Etienne e sua família pelo apoio enquanto estive em Recife realizando o isolamento das bactérias.

Aos membros do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio e amizade, em especial ao professor Newton Stamford, Arthur, Augusto, Estela, Jéssica e Fátima.

Aos pós-graduandos do PPGCS, Vinícius e Thiago Lira.

A ciência é, portanto, uma perversão de si mesma, a menos que tenha como fim último,  
melhorar a humanidade.

(Nikola Tesla)

## RESUMO

O feijão-fava é uma leguminosa produtora de grãos comestíveis com alto valor protéico, cultivada mundialmente, tendo no Brasil, a região Nordeste como principal produtora. Nessa região, a produção é feita com baixa utilização de tecnologia, o que resulta em baixos rendimentos. Entre as tecnologias utilizadas para aumentar a produção de leguminosas, pode-se destacar a inoculação das sementes com bactérias diazotróficas, com o objetivo de substituir ou reduzir a adubação nitrogenada. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade de rizóbios em simbiose com o feijão-fava adaptados às condições do Semiárido. Para a obtenção dos isolados foram utilizados dois acessos de feijão-fava (um de crescimento indeterminado e outro de crescimento determinado) e 12 amostras compostas de solo de diferentes mesorregiões dos estados da Paraíba e Pernambuco. As plantas foram cultivadas em uma área protegida com lona transparente, em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial de 12 (solos) x dois (acessos) em vasos de Leonard adaptados com garrafas PET contendo 1,3 L de areia e 100 mL de solo, com três repetições, por 55 dias. As variáveis analisadas foram: número de nódulos (NN), massa fresca de nódulos (MFN), biomassa específica dos nódulos (BEN), massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR). Os dados foram submetidos ao teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott. Dos nódulos coletados foram isoladas bactérias e determinadas suas características morfofisiológicas em meio de cultura, no laboratório de Microbiologia do Solo da UFRPE (Recife-PE). Com as características dos isolados calculou-se o coeficiente J e realizou o agrupamento das bactérias. O solo de Alagoa Grande-PB foi o que apresentou os maiores valores de NN e MFN, entretanto quando analisada a biomassa específica dos nódulos não se evidenciou diferenças. Para MSR obteve-se diferença apenas entre os acessos. Para MSPA foram observadas diferenças para ambos os fatores, destacando-se o solo de Alagoa Grande-PB, e dois solos de vegetação nativa, Areia-PB e Garanhuns-PE, sendo estes uma possível fonte de estirpes eficientes. O agrupamento das bactérias revelou que o acesso de crescimento determinado formou 13 grupos, enquanto o outro acesso, 24. Analisando-se todas as bactérias em um único dendrograma observou-se a formação de grupos com as bactérias de cada acesso separados e também unidos. Os acessos diferem quanto aos grupos de rizóbios capazes de formar simbiose.

**Palavras-chave:** *Phaseolus lunatus*, fixação biológica de nitrogênio, caracterização morfofisiológica e bactérias diazotróficas.

## ABSTRACT

The lima bean is a legume producer of edible grains with high protein value, cultivated worldwide, having in Brazil, the Northeast region as the main producer. In this region, the production is made with low use of technology, resulting in low yields. Among the technologies used to increase the production of legume, we can highlight the inoculation of seed with diazotrophic bacterias, with the objective of replace or reduce nitrogen fertilization. The aim of this study was to evaluate the diversity of rhizobia in symbiosis with the lima bean adapted to semiarid conditions. To obtain the isolated was used 02 accessions of lima bean (one of indeterminate growth and other of determinate growth) and 12 composite samples of soil from different mesoregions the states of Paraíba and Pernambuco. Plants were cultivated in a protected area with transparent canvas, in design completely randomized in factorial of 12 (soil) x two (accessions) in Leonard pots adapted with plastic bottle containing 1.3 L of sand and 100 mL soil, with three replicates, for 55 days. The variables analyzed were: number of nodules (NN), fresh mass of nodules (MFN), specifies biomass of nodules (BEN), dry mass of the part aerial (MSPA) and dry mass of root (MSR). Data were analyzed using the F test and the means compared by the Scott- Knott test. Of the collected nodules were isolated bacteria and determined their morphological and physiological characteristics in culture medium, in the laboratory of Soil Microbiology of UFRPE (Recife-PE). With the characteristics of the isolates was calculated the coefficient J and was performed the grouping of the bacteria. The soil of Alagoa Grande-PB showed the highest values for NN and MFN, however when analyzing the specific biomass of nodules no detectable differences. For MSR obtained only difference between accessions. And for MSPA differences were observed for both factors, emphasizing the soil of Alagoa Grande-PB, and two soils of native vegetation, Areia-PB and Garanhuns-PE, these being a possible source of efficient strains. The grouping of the bacteria showed that accession of growth determined formed 13 groups, while the other accession, 24. And analyzing all bacteria in one dendrogram were formed groups with bacteria of each separate accession and also united. Accessions differ in groups of rhizobia able to form symbiosis.

**Keywords:** *Phaseolus lunatus*, biological nitrogen fixation, morphophysiological characterization and diazotrophic bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Distribuição dos isolados dentro dos solos e acessos utilizados (CI = crescimento determinado e CD = crescimento indeterminado), quanto as características: tamanho da colônia (A), elasticidade da colônia (B), produção de muco (C), limpa com a alça (D), alteração do pH (E) e borda da colônia (F). Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014..... 28
- Figura 2 Distribuição dos isolados dentro dos solos e acessos utilizados (CI = crescimento determinado e CD = crescimento indeterminado), quanto às características: tempo de crescimento (A), elevação da colônia (B), transparência da colônia (C), aparência da colônia (D) e cor da colônia (E). Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014..... 30
- Figura 3 Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus*, acesso “cearense”. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014..... 32
- Figura 4 Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus*, acesso “faveta”. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014..... 33
- Figura 5 Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA de todos os isolados de *P. lunatus* obtidos. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014..... 34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição da origem e forma de uso da terra das amostras de solo utilizadas. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.....	19
Tabela 2	Caracterização química e de fertilidade das amostras de solo utilizadas para a coleta de nódulos. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.....	20
Tabela 3	Codificação binária das características morfofisiológicas dos isolados bacterianos. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.....	23
Tabela 4	Valores médios de número de nódulos por planta (NN), massa fresca de nódulos (MFN), biomassa específica de nódulos (BEN), massa seca de raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA) de plantas aos 55 dias após a emergência obtidos utilizando amostras de solos e dois acessos de <i>P. lunatus</i> . Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.....	25
Tabela 5	Número de estirpes obtidas nas diferentes amostras de solo utilizando como planta isca dois acessos de <i>P. lunatus</i> . Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.....	26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 FEIJÃO-FAVA.....	16
2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO.....	19
3.2 CULTIVO DE PLANTAS-ISCAS E COLETA DE NÓDULOS.....	20
3.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA.....	21
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>APÊNDICE</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Phaseolus lunatus* L. está entre as leguminosas produtoras de grãos de importância mundial. No nordeste do Brasil é conhecida como fava, entretanto também é denominada por outros nomes como feijão-fava, feijão-de-lima ou fava-de-lima (Santos et al., 2002). Serrano-Serrano et al. (2010) atribui sua origem como andina, possuindo três grupos genéticos distribuídos geograficamente, sendo um andino e dois mesoamericanos.

A cultura do feijão-fava está entre as leguminosas produtoras de grãos de importância mundial e é explorada comercialmente na América do Norte, América do Sul, Europa, leste e oeste da África e sudeste da Ásia (LOPES et al., 2010).

Devido ao seu teor de proteína e demais características nutricionais, este grão pode ser utilizado na alimentação humana em substituição ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) que apresenta menor adaptação a condições climáticas adversas, tais como altas temperaturas e déficit hídrico. (VIEIRA, 1992).

No Brasil é cultivada em todas as regiões, mas o Nordeste representa 91% da produção nacional, apesar da produtividade nesta região ser inferior a 500 kg ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2012).

O consumo no Brasil ocorre principalmente na forma de grãos verdes cozidos, também sendo consumido os grãos secos cozidos (SANTOS et al., 2002). Em contraste as baixas produções obtidas na região Nordeste, alguns trabalhos têm demonstrado produção superior a 1000 kg ha<sup>-1</sup>, atingindo resultados superiores a 2500 kg ha<sup>-1</sup> quando utilizada a adubação fosfatada (OLIVEIRA et al., 2004) e irrigação (MELO et al., 2009). Acarretando assim a possibilidade de aumento da produtividade da região por meio de práticas de manejo da cultura, entre estas o manejo da fertilidade do solo tem se mostrado promissora (OLIVEIRA et al., 2004; ALVES et al., 2008). Dentro do manejo da fertilidade, um dos nutrientes mais limitantes para a produção agrícola é o nitrogênio, deste modo, por meio da sua aplicação pode-se obter aumento na produção de fitomassa e de grãos nos cultivos agrícolas, isto devido a participação deste elemento nas proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e pigmentos (MALAVOLTA, 2006).

O feijão-fava é uma leguminosa que possui capacidade de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, denominadas genericamente de rizóbios. Santos et al. (2009a) observaram que a nodulação do feijão-fava ocorre antes dos 30 dias após a

emergência e o período de maior nodulação e massa dos nódulos ocorre na floração entre 45 e 60 dias após a emergência.

No Brasil já existem estirpes de rizóbio recomendadas para uma grande quantidade de culturas agrícolas e espécies florestais. Embora, na sua maioria, a utilização desta tecnologia é baixa devido a pouca difusão dos inoculantes, forma como é comercializada, uma exceção é a cultura da soja, a qual o inoculante é aplicado em grandes áreas e com grande sucesso. A utilização desse inoculante proporciona um produto mais competitivo no mercado e um agroecossistema mais sustentável, já que há uma grande economia com fertilizantes nitrogenados solúveis, considerando-se a área nacional cultivada com soja, esta chega a alguns bilhões de reais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os solos da região Nordeste, bem como os encontrados nos estados da Paraíba e Pernambuco devido a variabilidade de características químicas e físicas, condições climáticas e cobertura vegetal possuem uma diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que necessitam ser estudadas quanto ao seu potencial de fixação, possibilitando assim sua utilização para a produção de inoculantes.

A diversidade de rizóbios nativos pode ser inicialmente detectada por meio da avaliação das características culturais e morfológicas, deste modo identificando-se grupos taxonômicos de microrganismos, permitindo esta técnica boa aproximação em nível de gênero. A partir dos resultados é possível supor diferenças fisiológicas importantes entre microrganismos, que serão comprovadas com estudos mais refinados (PELCZAR Jr et al., 1997).

A riqueza de bactérias fixadoras de nitrogênio em solos do Nordeste já foi observada por Martins et al. (1997) em nódulos obtidos de raízes do feijão caupi, e por Santos et al. (2007) utilizando plantas dos gêneros *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*.

Entretanto, o conhecimento das bactérias capazes de nodular o feijão-fava nos solos desta região é escasso, existindo apenas um estudo no Brasil com solos de dez áreas com histórico de cultivo de feijão-fava em duas regiões do Estado do Piauí (SANTOS et al., 2011). E apesar dos solos pertencerem apenas a uma ordem (Argissolo) foram encontradas 50 estirpes de bactérias pertencentes a três gêneros de rizóbios *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*. Além deste estudo, outros foram realizados em outros países, sendo dois no Peru onde foram observadas bactérias do gênero *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (ORMEÑO et al., 2007), e *Bradyrhizobium* (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2006) e dois nos Estados Unidos onde foram relatadas a simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (TRIPLETT et al., 1981) e

*Bradyrhizobium* (THIES et al., 1991). Estes dados demonstram que *P. lunatus* apresenta baixa especificidade de hospedeiro, já sendo reportada simbiose com estirpes de quatro gêneros de rizóbios.

Neste contexto a obtenção e seleção de estirpes de rizóbios capazes de fixar nitrogênio associadas ao feijão-fava constitui a primeira etapa para a formulação de um produto biotecnológico e desponta com uma alternativa poderosa para o aumento da produtividade desta importante cultura na região Nordeste.

Deste modo o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade de rizóbios em simbiose com o feijão-fava adaptados às condições do Semiárido.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FEIJÃO-FAVA

A espécie *Phaseolus lunatus* é conhecida popularmente por diversos nomes, entre eles fava, feijão-fava, feijão-de-lima, bongé, feijol, mangalô-amargo, fava-belém, fava-terra, feijão espadinho, feijão-farinha, feijão-favona e feijão-figado-de-galinha (ANTUNES, 2010). Serrano-Serrano et al. (2010) atribuíram sua origem como andina, possuindo três grupos genéticos distribuídos geograficamente, sendo um andino e dois mesoamericanos. Os centros mesoamericanos são largamente distribuídos numa área que vai do México até a Argentina e Caribe, principalmente em altitudes do nível do mar até 1600 metros. Já o centro andino é restrito ao Equador e Peru. O material de origem mesoamericana é caracterizado pelas suas sementes pequenas e o andino por sementes grandes (BAUDOIN et al., 2004).

Suas folhas são trifoliadas e verdes, tendo uma coloração, em geral, mais escura que em outras espécies, mesmo após o amadurecimento da vagem. Suas estipulas são persistentes e seu comprimento varia de 1,5 a 2,5 mm. A forma do limbo varia de triangular a lanceolada. O pecíolo possui um comprimento que varia de 1,2 a 1,8 cm, podendo ser glabro ou pubescente. Os folíolos têm dimensões que variam de 6-8 x 4-6 cm, podendo ser ovados a rombóides, deltóides ou deltóide-ovados, membranosos ou subcoriáceos e glabros ou pubescentes, com base arredondada ou amplamente cunheada e o ápice é agudo. A inflorescência é do tipo racemo, podendo ocorrer de diferentes tamanhos, mas na maioria dos casos maiores que as folhas e com muitas flores. As flores são menores que 10 mm e com cores semelhantes ao do feijão-comum. A corola tem a coloração lilás, rosada a violeta ou branca. As brácteas possuem de 1 a 2 mm e são oblongo-ovaladas. As bractéolas são arredondadas e menores que o cálice (BEYRA; ARTILES, 2004).

As vargens são achatadas, recurvadas, coriáceas, pontiagudas, em alguns casos deiscentes e contém de duas a quatro sementes. Estas são rombóides, redondas ou em forma de rim, e possui uma variada coloração do tegumento, sendo branco, verde, cinza, amarelo a marrom, róseo, vermelho, púrpuro, preto ou manchado e sarapintado. O peso de 100 sementes varia de 30 a 300 gramas, o hilo é oblongo, curto e central, desta estrutura irradiam-se linhas até o dorso da sementes, característica que distingue o feijão-fava dos outros feijões (VIEIRA, 1992).

O material que é utilizado para o cultivo apresenta-se como uma cultura anual, bianual ou perene, e possui germinação epigea (BEYRA; ARTILES, 2004). Podendo ter o hábito de crescimento indeterminado trepador, com o desenvolvimento da gema terminal em uma guia, ou determinado anão, com o completo desenvolvimento da gema terminal em uma inflorescência (SANTOS et al., 2002). Com relação à reprodução esta planta pode ser autógama ou alógama, embora predomina a autógama (BAUDOIN et al., 1998).

Seu cultivo tem melhor desenvolvimento em solos areno-argilosos, férteis e bem drenados, tendo bom rendimento com pH entre 5,6 e 6,8 (VIEIRA, 1992).

O cultivo ocorre em todas as regiões brasileiras, entretanto a região nordeste apresenta cerca de 95% da área cultivada (Média do período 2006-2010), destacando-se os estados da Paraíba, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Piauí, os quais somam 93% da área plantada na região e 88% da área nacional. Na mesma proporção encontra-se distribuída a produção desta leguminosa, com uma produção média anual no período de 2006-2010 de 14370,2 toneladas na região Nordeste, sendo a principal produtora, representando 91% da produção nacional. Nesta mesma região a produtividade varia entre 285 e 468,2 kg ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2012).

Uma característica do seu cultivo é o consorcio com outras culturas (mamona, mandioca e milho) ou espécies arbóreas (LOPES et al., 2010), isto podendo ser relacionado com o fato de ser realizado em sua maioria (74%) por agricultores com propriedades com área inferior à 10 ha (IBGE, 2012).

## 2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de N<sup>2</sup> é um processo com alto gasto de energia, sendo esta proveniente de carboidratos da planta hospedeira que em troca recebe o nitrogênio fixado, contudo é uma simbiose muito importante para aumentar a absorção de nitrogênio, tendo em vista a baixa disponibilidade deste elemento nos solos tropicais. A formação do nódulo ocorre após a bactéria identificar o hospedeiro e entrar a sua raiz, assim colonizando as células do córtex. Após a formação dos nódulos, as bactérias param de se multiplicar e parte sofre modificações até se tornarem bacteróides, forma capaz de fixar o N<sub>2</sub> por meio da enzima nitrogenase (FIGUEIREDO et al., 2008).

Entre as condições ambientais que afetam a nodulação podemos citar temperatura, umidade, salinidade, acidez e nutrientes (principalmente P e Mo). Além dos fatores

ambientais, a simbiose também é influenciada pela utilização de agrotóxicos, presença de elementos tóxicos, outras práticas de manejo e atividades de mineração, bem como características da população nativa de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular a planta hospedeira (principalmente, tamanho e competitividade) e por fim características intrínsecas da planta hospedeira (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Poucos estudos de seleção de rizóbios para o feijão-fava foram realizados, Antunes et al. (2011) avaliaram a eficiência de alguns isolados coletados e descritos por Santos (2008) em vasos com solução nutritiva utilizando como critério a massa seca da parte aérea, neste trabalho foram encontrados isolados duas vezes mais eficientes que a testemunha utilizada, embora o resultado positivo, para melhores conclusões seriam necessários ensaios em campo e comparações com testemunhas com adubação nitrogenada.

Thies et al. (1991) demonstraram que a eficiência da inoculação no feijão-fava varia entre solos, tendo encontrado maiores respostas a inoculação em solos com uma baixa população de bactérias capazes de nodular a cultura, assim evidenciado a baixa competitividade das estirpes testadas. A resposta de estirpes em solos do nordeste também diferiu, sendo obtido melhor resposta em solos de pH mais neutro e boa disponibilidade de cálcio, magnésio e fósforo (Aguar et al., 2012).

Outro ponto importante a ser destacado é o estudo e a seleção de estirpes para diferentes cultivares da cultura alvo, assim tendo-se a garantia da eficiência do inoculante. Isto foi verificado por Freitas et al. (2012) avaliando em campo duas estirpes de rizóbios recomendadas para o feijão caupi, em diferentes cultivares locais desta espécie nas condições do semiárido nordestino. Neste estudo, para algumas variedades, a maior produção de grãos foi obtida sem a inoculação, assim tendo o inoculante efeito negativo nesta variável, devido a maior adaptação dos rizóbios nativos a simbiose com as cultivares locais e conseqüentemente maior eficiência na fixação de N. Assim, acredita-se que os solos das regiões semiáridas podem ser utilizados como fonte para o isolamento de novas bactérias para a produção de inoculantes adaptadas às condições desta região com respostas diferenciadas quando comparadas com outras bactérias já recomendadas, mas obtidas de diferentes condições edafoclimáticas. Vieira et al. (2008) também relataram que para o feijoeiro (*P. vulgaris*), cultivares de crescimento indeterminado apresentam fixação de nitrogênio superior as de crescimento determinado, tendo em vista o maior período de crescimento da planta que possibilita uma maior transferência de N para a mesma.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO

Foram coletadas 12 amostras compostas de solo na camada de 0-20 cm de profundidade, em diferentes regiões dos estados da Paraíba e Pernambuco buscando-se abranger diferentes condições edafoclimáticas, visando-se assim uma maior diversidade de bactérias capazes de nodular a cultura de feijão-fava. As amostras foram compostas por três subamostras. As áreas de coleta foram selecionadas de acordo com a acessibilidade, entretanto, foi dada preferência a áreas com histórico de cultivo de feijão-fava ou feijão-comum (*P. vulgaris* L.) e com vegetação nativa. Na tabela 1 está descrito o município de origem das amostras de solo utilizadas na pesquisa, bem como o uso da terra no momento da coleta.

**Tabela 1.** Descrição da origem e forma de uso da terra das amostras de solo utilizadas. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.

<b>Município</b>	<b>Uso da terra</b>
Alagoinha-PB	Cultivo de <i>P. lunatus</i> consorciado com milho
Alagoinha-PB	Vegetação nativa
Alagoa Grande-PB	Cultivo de <i>P. lunatus</i> consorciado com milho
Areia-PB	Cultivo de <i>P. vulgaris</i>
Areia-PB	Vegetação nativa
Garanhus-PE	Cultivo de <i>P. lunatus</i> consorciado com milho
Garanhus-PE	Vegetação nativa
Massaranduba-PB	Cultivo de <i>P. lunatus</i> consorciado com milho
Santa Maria da Boa Vista-PE	Vegetação nativa
Sapé-PB	Cultivo de <i>P. lunatus</i> consorciado com milho
Serra Talhado-PE	Vegetação nativa
São José do Egito-PE	Vegetação nativa

Após a coleta, as amostras foram secas ao ar, destorroadas e peneiradas em malha de 02 mm, sendo uma parte de cada amostra encaminhada para o Laboratório de Química e Fertilidade do Solo do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba para análise quanto as características químicas e de fertilidade (Tabela 2) de acordo com a metodologia de Tedesco et al. (1995). Os valores de pH foram obtidos em água (1:2,5) utilizando um potenciômetro com eletrodo combinado, os teores de fósforo (P), potássio (K) e sódio (Na) foram obtidos utilizando a solução extratora de Mehlich-1, a determinação do

H+Al foi realizada com solução extratora de acetato de cálcio a 0,5 mol L<sup>-1</sup> em pH 7, e os valores de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al) com solução extratora de cloreto de potássio a 1 mol L<sup>-1</sup> (KCl 1 mol L<sup>-1</sup>). A quantificação da matéria orgânica foi feita após oxidação em via úmida com solução de dicromato de potássio a 0,2 mol L<sup>-1</sup> (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) em meio sulfúrico e titulação com solução de EDTA 0,0125 mol L<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.** Caracterização química e de fertilidade das amostras de solo utilizadas para a coleta de nódulos. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.

Amostra	pH H <sub>2</sub> O (1:2,5)	P	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>3+</sup>	Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	SB	CTC	V	M	M.O.
		-- mg dm <sup>-3</sup> --			----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			----- % -----			g kg <sup>-1</sup>		
ALF	5,9	24,2	224,4	0,04	3,38	0,00	3,6	2,1	6,2	9,6	65	0	16,9
ALM	5,3	12,1	181,6	0,07	2,48	0,00	1,9	1,3	3,7	6,2	60	0	10,1
AG	5,9	17,4	192,5	0,14	3,38	0,00	6,8	3,5	10,9	14,3	76	0	42,9
AF	6,2	16,3	362,7	0,07	3,22	0,00	7,2	4,5	12,6	15,8	80	0	25,6
AM	5,8	4,6	167,9	0,09	3,38	0,00	6,3	3,6	10,4	13,8	76	0	31,0
GAF	7,0	260,8	403,4	0,02	1,65	0,00	8,3	1,9	11,2	12,8	87	0	18,1
GAM	7,3	281,8	421,5	0,25	1,40	0,00	7,7	2,3	11,2	12,6	89	0	25,1
MA	5,1	16,2	140,1	0,11	6,85	0,25	3,2	1,9	5,5	12,4	45	4	33,1
SM	6,5	7,3	76,1	0,08	1,07	0,00	5,4	3,0	8,7	9,8	89	0	9,4
AS	7,6	68,7	313,1	0,14	1,07	0,00	8,9	2,1	12,0	13,0	92	0	23,3
ST	6,7	20,0	331,2	0,06	1,57	0,00	4,1	2,5	7,5	9,0	83	0	12,6
SJ	5,6	15,7	116,8	0,04	2,97	0,00	8,5	2,5	11,3	14,3	79	0	23,7

MO = Matéria orgânica; SB = Soma de bases (Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>+K<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>); CTC efetiva = Capacidade de troca catiônica efetiva (SB + Al<sup>3+</sup>); CTC total = Capacidade de troca catiônica total [SB+ (H<sup>+</sup>+Al<sup>3+</sup>)]; V = Saturação por bases [(SB/CTC) x 100]; ALF = Alagoinha-PB, cultivo de *P. lunatus*; ALM = Alagoinha-PB, vegetação nativa; AG = Alagoa Grande- PB, cultivo de *P. lunatus*; AF = Areia-PB, cultivo de *P. vulgaris*; AM = Areia-PB, vegetação nativa; GAF = Garanhuns-PE, cultivo de *P. lunatus* ; GAM = Garanhuns-PE, vegetação nativa; MA = Massaranduba-PB, cultivo de *P. lunatus*; SM = Santa Maria da Boa Vista-PE, vegetação nativa; SA = Sapé-PB, cultivo de *P. lunatus* ; ST = Serra Talhada-PE, vegetação nativa; SJ = São José do Egito-PE, vegetação nativa.

### 3.2 CULTIVO DE PLANTAS-ISCAS E COLETA DE NÓDULOS

Para a obtenção dos isolados bacterianos foram utilizados dois acessos de feijão-fava como planta isca, sendo uma de crescimento indeterminado (denominada popularmente de “cearense”, de coloração do tegumento bege) e outra de crescimento determinado (“faveta ou fava de moita”, de coloração de tegumento branca). O cultivo das plantas foi realizado em uma propriedade particular no município de São José do Egito-PE, em vasos Leonard adaptados com garrafas PET (SANTOS et al., 2009b) com capacidade para 1,5 L, sendo como

substrato utilizado 1,3 L de areia (lavada e fervida por 2 horas) e 0,1 L da amostra de solo (fonte de inóculo), correspondente ao tratamento. Tendo em vista a pequena quantidade de solo utilizada nos vasos, semanalmente foram adicionados em cada vaso, 100 mL da solução nutritiva de Norris (NORRIS, 1964) isenta de nitrogênio para suprir a demanda de nutrientes pela cultura.

Em cada vaso foram colocadas três sementes previamente desinfestadas por 60 segundos em álcool etílico a 70%, 3 minutos em uma solução com hipoclorito de sódio a 1% e em seguida realizada 10 lavagens em água estéril (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994). Aos sete dias após a emergência foi realizado o desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso.

A coleta do experimento ocorreu aos 55 dias após emergência das plântulas, nesta ocasião, a parte aérea foi cortada na altura do substrato e a raiz foi separada do substrato com o auxílio de água, em seguida foram coletados todos os nódulos. A parte aérea e a raiz foram colocadas em sacos de papel identificados e levados para secar em estufa de circulação de ar a 65°C, após atingirem peso constante foi determinada a massa seca da parte aérea e da raiz de cada planta, em gramas. Os nódulos foram contados e colocados em recipientes contendo sílica-gel para retirar o excesso de água da lavagem, após 6 horas os nódulos foram pesados em balança de precisão de 0,001 g, determinando-se assim, a massa fresca, em gramas. Utilizando a massa fresca dos nódulos dividida pela quantidade de nódulos de cada planta foi calculada a biomassa específica dos nódulos, em miligramas.

### 3.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS RIZÓBIOS

Os nódulos coletados foram conservados em recipientes com sílica-gel e conduzidos para o laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Sede) em Recife – PE, onde cinco nódulos de cada repetição, quando existentes, tendo em vista que algumas repetições produziram quantidade inferior a cinco nódulos, foram reidratados por 12 horas e tratados com uma solução de álcool etílico a 70% por um minuto, para quebrar a tensão superficial, e com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por três minutos, para desinfestá-los superficialmente, sendo em seguida, lavados por 10 vezes com água estéril para retirar o excesso de hipoclorito. Após esse tratamento, os nódulos foram levemente pressionados com uma pinça sobre uma placa de Petri contendo meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar) com corante vermelho do congo.

As placas foram levadas para BOD regulada a 28°C até o aparecimento de colônias. Após purificação, as colônias que se apresentaram isentas de contaminantes foram repicadas com uma alça de platina para placas de Petri contendo meio YMA com corante azul de bromotimol e caracterizadas conforme descrito por Vincent (1970).

Para cada isolado foram avaliadas as seguintes características das colônias: 1) tempo necessário em dias para o aparecimento de uma colônia; 2) pH do meio após o crescimento celular, o qual foi determinado pela coloração do meio de cultura contendo azul de bromotimol, os isolados acidificantes tornaram o meio amarelo e os alcalinizantes tornaram o meio verde azulado e os neutros não modificaram a coloração do meio de cultura; 3) tamanho da colônia em mm; 4) forma da colônia; 5) borda da colônia; 6) aparência da colônia (homogênea ou heterogênea); 7) transparência da colônia; 8) cor da colônia (branca, amarela, creme, incolor e laranja); 9) elevação da colônia; 10) produção de muco; 11) quantidade de muco (pouco, médio e muito); e 12) elasticidade (observada a partir da formação ou não de fio, no momento da remoção do muco do meio de cultura com o auxílio da alça de platina). Após a caracterização, os isolados foram estocados em tubos de ensaios com o meio YMA (Vincent, 1970), e após o crescimento das colônias foi colocada vaselina líquida nos tubos e estes foram mantidos em temperatura ambiente, as bactérias também foram estocadas no meio TY (extrato de levedura e tripton) contendo 15% de glicerol a -10° C (freezer).

### 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A variável número de nódulos foi transformada pela equação  $y=\log(x+1)$ , e os dados de massa fresca de nódulos, massa específica do nódulo e massa seca da parte aérea e da raiz foram transformadas pela raiz quadrada para ajustamento aos pré-requisitos da análise de variância (ANOVA). Os dados transformados foram submetidos à ANOVA utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2010) e as médias foram comparadas utilizando o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados da caracterização foram codificados em uma matriz binária (0 e 1) (Tabela 3), que foi utilizada para calcular o coeficiente de similaridade de Jaccard, com este coeficiente foi realizado o agrupamento das estirpes por meio do algoritmo UPGMA, e em seguida construído um dendrograma com a finalidade de separar os grupos de isolados com maiores similaridades, estas análises foram realizadas no programa NtsysPC versão 2.0 (ROHLF, 2000).

**Tabela 3.** Codificação binária das características morfofisiológicas dos isolados bacterianos. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.

Característica	Valor binário	
	0	1
Borda da colônia	Irregular	Regular
Elevação da colônia	Não	Sim
Transparência da colônia	Não	Sim
Produção de muco	Não	Sim
Quantidade de muco	Ausente e pouca	Média e abundante
Aparência da colônia	Heterogênea	Homogênea
Limpa com a alça	Não	Sim
Elasticidade da colônia	Não	Sim
Alteração do pH do meio	Ácido	Alcalino e neutro
Cor da colônia	Creme	Branca, amarela, incolor e laranja
Tempo de crescimento	1 e 2 dias	Maior que 2 dias
Tamanho da colônia	Até 2 mm	Maior que 2 mm

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada interação entre as amostras de solo e os acessos utilizados, havendo diferença apenas entre os solos para as variáveis: número de nódulos (NN), massa fresca de nódulos (MFN) e massa seca da parte aérea (MSPA). Entretanto, observando-se os acessos, estes diferiram apenas quanto a massa seca da raiz (MSR) e MSPA (Tabela 4). Todas as amostras que foram coletados em áreas cultivadas com o feijão-fava apresentaram altos valores de NN, destacando-se com o maior valor a amostra coletada de Alagoa Grande-PB que teve em média 231 nódulos por planta, em seguida ficaram as outras áreas cultivadas com o feijão fava e duas amostras de áreas de vegetação nativa. Estes resultados corroboram com a ideia de que a presença da planta hospedeira está relacionada com a presença de uma população de rizóbios capaz de formar nódulos com esta mesma espécie (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A área cultivada com feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) apresentou baixos valores de NN, o que pode indicar uma baixa população de rizóbios neste solo ou uma incompatibilidade entre as bactérias que nodulam estas duas espécies de feijão como referenciado por Allen & Allen (1991). Estes autores consideram os rizóbios que nodulam o feijão caupi, como sendo os responsáveis pela nodulação do *P. lunatus*.

Para a MFN foi observada diferença apenas entre o solo de Alagoa Grande-PB, em relação aos demais solos utilizados no experimento, isto pode ser explicado pela biomassa específica dos nódulos (BEN), uma vez que o valor expressivo de NN do solo em destaque conferiu uma maior MFN, enquanto que nos solos com os menores valores de NN, tiveram altos valores de BEN, indicando que havia poucos nódulos, mas os mesmos eram grandes. Apesar das diferenças observadas no BEN, não foram observadas diferenças para esta variável, fato este que está ligado a grande variância dos dados mesmo após a transformação, reduzindo assim a sensibilidade do teste de ANOVA do teste de média.

Quanto a MSR foram observadas diferenças apenas entre os acessos, tendo o acesso “cearense” o maior valor neste parâmetro, o que pode está relacionado ao seu hábito de crescimento indeterminado, que gera a necessidade de um maior sistema radicular para uma melhor sustentação no solo e nutrição da planta. Em contraste com os resultados obtidos, Santos (2008) utilizando dois solos cultivados com feijão-fava e dois acessos desta espécie, obteve diferença significativa apenas para o NN entre os acessos, justificando este resultado

com a diferença de tamanho entre as sementes dos mesmos, tendo o material de sementes grande obtido o maior valor de NN.

A MSPA foi a única variável onde ocorreu diferença para os dois fatores estudados, tendo o acesso “cearense” o maior valor deste parâmetro, fato este também explicado pelo hábito de crescimento. Quanto aos solos, três áreas se destacaram nesse ponto, sendo elas a área de Alagoa Grande-PB cultivada com feijão-fava e duas áreas de vegetação nativa, uma em Garanhuns-PE e outra em Areia-PB, sendo que as duas últimas não apresentaram altos valores de NN (Tabela 4). Enquanto, outras áreas de vegetação nativa que apresentaram altos valores de matéria orgânica no solo, não tiveram as mesmas respostas no acréscimo de MSPA, sendo este comportamento, um indicativo que estas áreas podem ser possíveis fontes de bactérias com alta eficiência na fixação biológica de N (ZILLI et al. 2006).

**Tabela 4.** Valores médios de número de nódulos por planta (NN), massa fresca de nódulos (MFN), biomassa específica de nódulos (BEN), massa seca de raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA) de plantas aos 55 dias após a emergência obtidos utilizando amostras de solos e dois acessos de *P. lunatus*. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.

Solos	NN	MFN (g)	BEN (mg)	MSR (g)	MSPA (g)
ALF	93,33 b	0,17 B	5,03 a	0,59 a	0,89 b
ALM	43,83 b	0,19 B	2,93 a	0,67 a	1,25 b
AG	231,17 a	1,21 A	5,15 a	0,66 a	1,78 a
AF	6,33 c	0,22 B	18,96 a	0,84 a	1,26 b
AM	15,67 c	0,28 B	6,92 a	0,88 a	1,47 a
GAF	36,67 b	0,38 B	8,28 a	0,65 a	1,06 b
GAM	17,20 b	0,26 B	13,60 a	0,86 a	1,39 a
MA	63,33 b	0,27 B	3,97 a	0,56 a	1,03 b
SM	1,83 c	0,03 b	3,65 a	0,68 a	1,00 b
SA	45,67 b	0,48 b	17,06 a	0,74 a	1,07 b
ST	10,17 c	0,19 b	36,64 a	0,72 a	1,11 b
SJ	18,00 c	0,26 b	65,85 a	0,75 a	1,26 b
CV%	52	87	127	14	14
<b>Acessos</b>					
“Faveta”	41,69 a	0,36 a	18,63 a	0,57 b	1,13 b
“Cearense”	55,56 a	0,29 a	12,71 a	0,86 a	1,30 a

ALF = Alagoinha-PB, cultivo de *P. lunatus*; ALM = Alagoinha-PB, vegetação nativa; AG = Alagoa Grande- PB, cultivo de *P. lunatus*; AF = Areia-PB, cultivo de *P. vulgaris*; AM = Areia-PB, vegetação nativa; GAF = Garanhuns-PE, cultivo de *P. lunatus* ; GAM = Garanhuns-PE, vegetação nativa; MA = Massaranduba-PB, cultivo de *P. lunatus*; SM = Santa Maria da Boa Vista-PE, vegetação nativa; SA = Sapé-PB, cultivo de *P. lunatus* ; ST = Serra Talhada-PE, vegetação nativa; SJ = São José do Egito-PE, vegetação nativa. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-knott ao nível de 5%.

Dos nódulos coletados foram isoladas e caracterizadas 588 bactérias, sendo 427 isoladas do acesso “cearense” e 161 do “faveta ou fava de moita”. Destaca-se que é possível observar a quantidade de isolados por amostra de solo e acesso utilizado como planta-isca, ficando evidente que na maioria dos casos, foram isolados mais estirpes do acesso “cearense”, e que o solo coletado em Santa Maria da Boa Vista-PE não produziu nódulos no acesso “faveta” impossibilitando o isolamento de bactérias (Tabela 5).

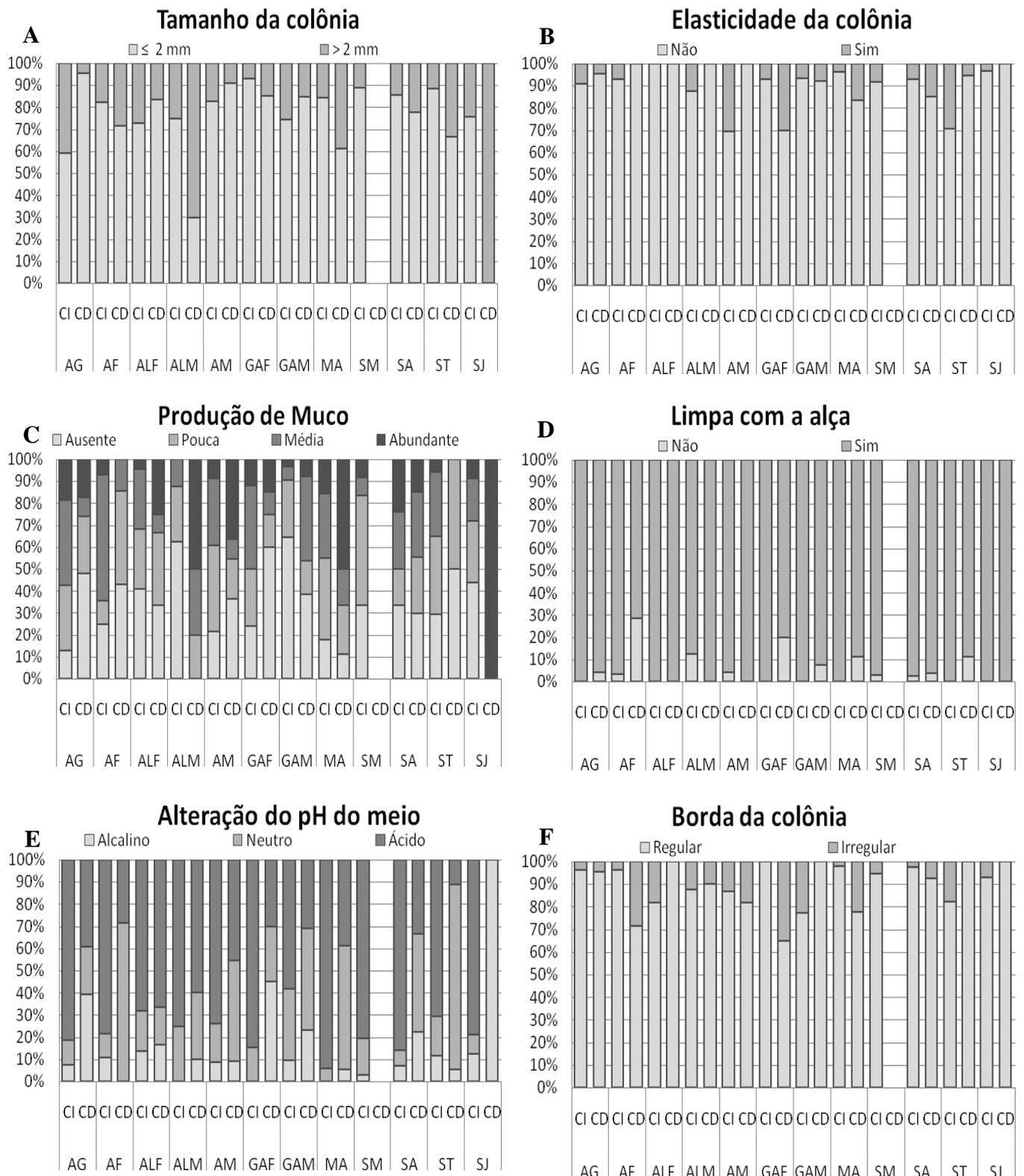
**Tabela 5.** Número de estirpes obtidas nas diferentes amostras de solo utilizando como planta isca dois acessos de *P. lunatus*. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.

Origem do solo	Acessos		Total
	“Faveta”	“Cearense”	
ALF	12	22	34
ALM	10	8	18
AG	23	54	77
AF	7	28	35
AM	11	23	34
GAF	20	58	78
GAM	13	31	44
MA	18	51	69
SM	0	36	36
SA	27	42	69
ST	18	17	35
SJ	2	57	59
<b>Total</b>	<b>161</b>	<b>427</b>	<b>588</b>

ALF = Alagoinha-PB, cultivo de *P. lunatus*; ALM = Alagoinha-PB, vegetação nativa; AG = Alagoa Grande- PB, cultivo de *P. lunatus*; AF = Areia-PB, cultivo de *P. vulgaris*; AM = Areia-PB, vegetação nativa; GAF = Garanhuns-PE, cultivo de *P. lunatus* ; GAM = Garanhuns-PE, vegetação nativa; MA = Massaranduba-PB, cultivo de *P. lunatus*; SM = Santa Maria da Boa Vista-PE, vegetação nativa; SA = Sapé-PB, cultivo de *P. lunatus* ; ST = Serra Talhada-PE, vegetação nativa; SJ = São José do Egito-PE, vegetação nativa.

Quanto às características das colônias predominaram colônias com menos de 02 mm (Figura 1 A), com exceção dos solos de Alagoinha e de São José do Egito, ambos com vegetação nativa, onde predominaram colônias maiores que 02 mm. A maioria das bactérias, não apresentaram elasticidade (91%), com exceção de três solos, onde mais de 30% dos isolados apresentaram elasticidade (Figura 1 B), sendo um no acesso de crescimento determinado e dois no de crescimento indeterminado. Em relação à produção de muco pelas bactérias (Figura 1 C), a distribuição variou bastante dentro dos solos e entre os acessos, também não sendo observada uma relação entre uma produção abundante de muco e as áreas

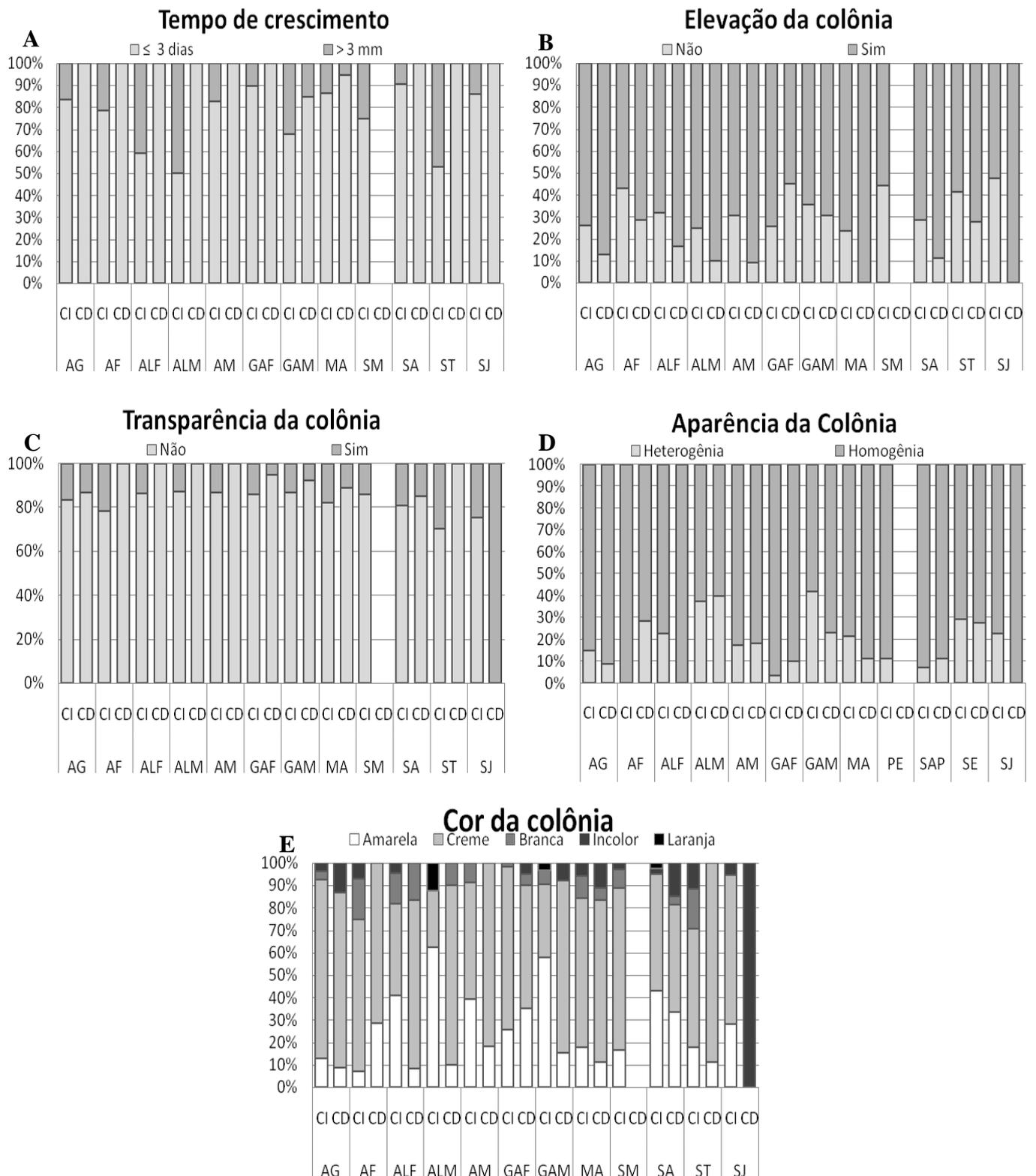
das mesorregiões mais secas, sendo que dos três solos da região do sertão (Santa Maria da Boa Vista, Serra Talhada e São José do Egito-PE) apenas um mostrou mais de 20% de bactérias com produção abundante de muco. Entretanto, nesta área foram isoladas apenas duas bactérias. Em sete das 12 amostras, a produção de muco considerada abundante foi maior no acesso “faveta”. Em 99% dos isolados no acesso “cearense” as colônias limpam a placa de petri, quando passada a alça de platina, não retornando ou resistindo ao movimento, enquanto no acesso “faveta” este valor foi de 92%. Constatou-se que 68% dos isolados alteraram o pH do meio de cultura para a faixa ácida após o crescimento bacteriano. Entretanto, a distribuição desta característica diferiu entre os acessos, sendo que 80% das bactérias isoladas do acesso de crescimento indeterminado apresentou reação ácida, enquanto no outro acesso apenas 36% teve esta particularidade, predominando bactérias de reação neutra. Aproximadamente 90% das colônias de ambos os acessos apresentaram bordas regulares (Figura 1 F).



**Figura 1.** Distribuição dos isolados dentro dos solos e acessos utilizados (CI = crescimento determinado e CD = crescimento indeterminado), quanto as características: tamanho da colônia (A), elasticidade da colônia (B), produção de muco (C), limpa com a alça (D), alteração do pH (E) e borda da colônia (F). Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014..

Observa-se que dentre os isolados predominaram bactérias de crescimento rápido ( $\leq$  03 dias), entretanto 98% dos isolados do acesso de crescimento determinado têm esta característica havendo apenas dois solos com bactérias de crescimento intermediário ou lento, no outro acesso este valor foi inferior (80%), existindo bactérias de crescimento intermediário ou lento em todos os solos (Figura 2 A). A maioria das colônias apresentou elevação (Figura 2 B) ocorrendo com maior frequência nos isolados do acesso “faveta” (81%), enquanto que nos isolado do acesso “cearense” apenas 67% apresentaram este comportamento. Por outro lado, colônias transparentes apareceram mais nos isolados do acesso de crescimento indeterminado (18%), existindo cinco amostras do acesso de crescimento determinado onde não foi observada esta característica. As colônias apresentaram-se homogêneas e com cor (Figura 2 E) predominante creme (64%) e amarela (25%), embora em alguns solos, também foram observadas as cores: branca (5%), laranja (1%) e colônias incolores (5%). A mesma quantidade de cores não foi observada por Santos (2008), que observou a maioria das colônias com cor branca e aspecto leitoso, e o restante das colônias transparentes, não sendo descritas colônias de cor creme ou amarelas que foram cores constantes neste trabalho. Colônias de cor amarela são citadas como incomum por Hungria (1994), entretanto elas estão sendo comumente encontradas em trabalhos com solos do nordeste (SANTOS et al, 2007; ANDRADE, 2013; NASCIMENTO, 2013).

A coleção de isolados obtida por Santos (2008) diferiu das descritas neste estudo, sendo observado que todos os isolados reportados por este autor apresentaram elevação, 52% tiveram crescimento rápido (em até 03 dias) e 48% intermediário (04 e 05 dias), a maioria produziu uma grande quantidade de muco, existindo apenas uma sem produção. Quanto a alteração de pH do meio, o mesmo autor constatou colônias com reação ácida, entretanto, observou-se diferença na proporção destas entre os solos, existindo maior quantidade de bactérias com crescimento intermediário e reação alcalina no solo de Nova Esperança-PI, tendo que os valores de colônias com elevação, de crescimento intermediário e reação alcalina foram maiores do que os obtidos neste estudo, também não ocorrendo o predomínio de colônias de reação alcalina em nenhum dos solos estudados.



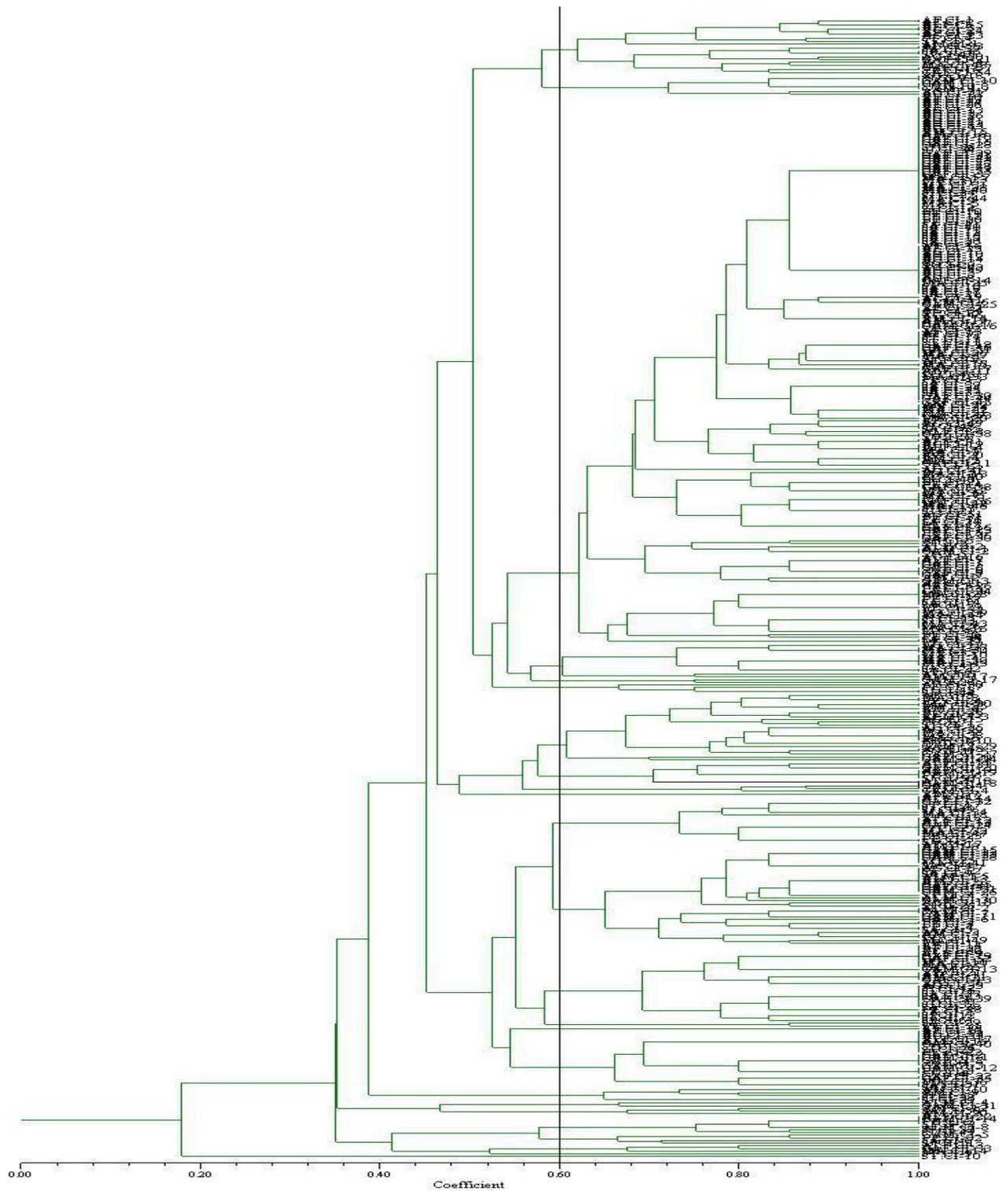
**Figura 2.** Distribuição dos isolados dentro dos solos e acessos utilizados (CI = crescimento determinado e CD = crescimento indeterminado), quanto às características: tempo de crescimento (A), elevação da colônia (B), transparência da colônia (C), aparência da colônia (D) e cor da colônia (E). Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.

Com base nas características descritas anteriormente do acesso “cearense” foi construído o dendrograma (Figura 3), no qual pode-se observar que a um nível de 60% de similaridade pelo coeficiente de Jaccard, as 427 bactérias formaram 24 grupos, tendo alguns uma única bactéria e outros de mais de 100 bactérias. Além disso, existem bactérias de solos distintos que apresentam bactérias com 100% de similaridade. Este valor é muito superior ao obtido por Santos (2008), que foi de 05 grupos ao nível de 64% de similaridade, sendo este valor explicado pela maior quantidade e maior área de abrangência (diferentes mesorregiões) das amostras de solos utilizadas no presente experimento.

No dendrograma do acesso “faveta” (Figura 4), mostra que as 161 bactérias formaram 13 grupos com similaridade de 60%, igualmente ao observado no dendrograma anterior (Figura 3) no qual existem grupos de uma única bactéria e grupos de grandes quantidades de indivíduos, neste caso mais de 50.

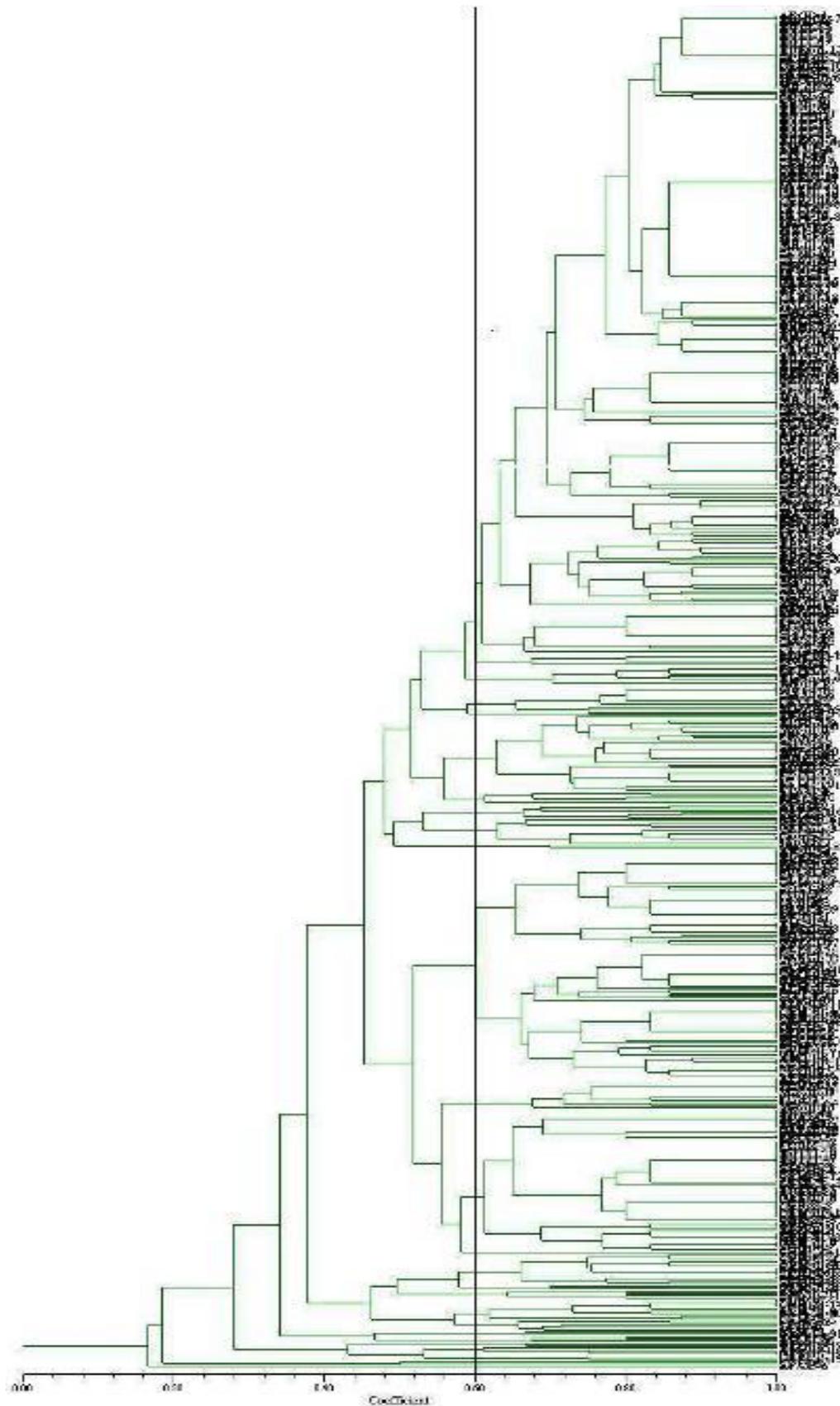
Para comparar a diversidade dos dois acessos foi construído o dendrograma (Figura 5) com todos os isolados. Nele são observados 26 grupos com 60% de similaridade, deste modo tem-se cinco grupos formados apenas por bactérias isoladas do acesso de crescimento determinado, 12 do acesso de crescimento indeterminado e nove de ambos os acessos. Assim, as bactérias do acesso de crescimento indeterminado apresentaram maior diversidade quanto às características morfofisiológicas, e embora menos diverso, o outro grupo, destaca-se por formar grupos isolados indicando que os acessos possuem especificidade diferente quanto às bactérias formadoras de nódulos. A especificidade entre estirpes e acessos foi observada para o feijão caupi por Xavier et al. (2006), os quais destacaram que os acessos brasileiros resultaram numa maior taxa de ocupação dos nódulos que os oriundo do EUA e Nigéria, sendo este fato relacionado a origem das estirpes utilizadas no experimento, que foram isoladas de solos do nordeste. Igualmente, Franco et al. (2002) obtiveram diferença no potencial de nodulação de cultivares de feijão comum entre os conjuntos gênicos andino e meso-americano, porém não foi evidenciada restrição da nodulação.

Por meio das análises utilizadas é possível uma visualização de grupos com características distintas, mas são necessários estudos complementares com ferramentas da biologia molecular para uma classificação mais detalhadas das bactérias, podendo-se chegar ao nível de espécie. Desde modo a caracterização morfofisiológica das bactérias permite uma análise prévia da diversidade e a formação dos grupos que serão utilizados para redução da quantidade de estirpes a serem submetidas aos métodos moleculares que apresentam um alto custo.



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus*, acesso “cearense”. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.





**Figura 5.** Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA de todos os isolados de *P. lunatus* obtidos. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.

## **5 CONCLUSÕES**

Os solos cultivados originalmente, com a espécie utilizada como planta isca foram os que apresentaram o maior número de nódulos por planta.

O acesso de feijão-fava de crescimento indeterminado (“cearense”) foi o que forneceu a maior diversidade de bactérias isoladas.

Os acessos utilizados nesta pesquisa diferem no reconhecimento de grupos de rizóbios capazes de formar simbiose, tendo o acesso com hábito de crescimento determinado (“faveta”) maior especificidade hospedeira.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, F. L.; SIMÃO, L. P. L.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; MARTINS, L. V.; TORRES, E. B.; SANTIAGO, F. E. M.; MOREIRA, F. M. S. Crescimento inicial de *Phaseolus Lunatus* L. inoculado com INPA 03-11B e UFLA 03-84 em solos representativos do Sudoeste Piauiense. In: FertBio 2012, 2012. *Anais*. Maceió-Al, SBCS, 2012. CD-ROM

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The leguminosae**; a source book of characteristics, uses, and nodulation. Madison: The University of Wisconsin Press, 1991. 812 p.

ALVES, U. A.; OLIVEIRA, A. P.; ALVES, A. U.; DORNELAS, C. S. M.; ALVES, E. U.; CARDOSO, E. A.; OLIVEIRA, A. N. P.; CRUZ, I. S. Lima beans production and economic revenue as function of organic and mineral fertilization. *Horticultura Brasileira*, v. 26, n. 2, p. 251-254, 2008.

ANDRADE, M. M. M. **Populações bacterianas nodulíferas de leguminosas em solos da caatinga com distintos períodos de regeneração**. 2013. 86. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ANTUNES, J. E. L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. 2010. 108 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal do Piauí, Teresina.

ANTUNES, J. E. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência Simbiótica de Isolados de Rizóbio Noduladores de Feijão-Fava (*Phaseolus lunatus* L.). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, n.35, p. 751-757, 2011.

BAUDOIN, J. P.; DEGREEF, J.; HARDY, O. JANART, F.; ZORO BI, I. Development of an *in situ* conservation strategy for wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) populations in the central valley of Costa Rica. In: J. OWENS, S. J.; RUDALL, P. J. [Eds.]. **Reproduction Biology**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1998. P. 417-426.

BAUDOIN, J. P.; ROCHA, O.; DEGREEF, J.; MAQUET, A.; GUARINO, L.

**Ecogeography, demography, diversity and conservation of *Phaseolus lunatus* L in the Central Valley of Costa Rica.** Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 12 International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 2004.

BEYRA, A.; ARTILES, G. R. Revisión taxonômica de los gêneros *Phaseolus* y *Vigna* (Leguminosae – Papilonoideae) en Cuba. **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**, v. 61, n. 2, p. 135-154, 2004.

FERREIRA, D. F. **Programa SISVAR.** Sistema de Análise de Variância. Versão 5.1 (Build 7.2). Lavras: DEX/UFLA, 2010.

FIGUEIREDO, B. V. M.; BURITY, A. H.; STAMFORD, P. N.; SILVA, S. R. E. C. **Microrganismos e Agobiodiversidade:** o novo desafio para a agricultura. Guaíba: Agrolivros, 2008.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C.; TSAI, S. M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, n.8, p.1145-1150, 2002.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass and Bioenergy**, n. 45, p. 109-114, 2012.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Centro Nacional de Soja. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542p. (EMBRAPA-CNPAP, Documentos, 46).

IBGE. Banco de dados agregados: pesquisas: **produção agrícola municipal.** Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em 06 de agosto de 2012.

- LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; ARAUJO, A. S. F. **A cultura do feijão-fava no meio-norte do Brasil**. Teresina: EDUFPI, 2010. 272 p.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo. Ceres. 2006. 638 p.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, n.29, p.1005–1010, 1997.
- MELO, L. J. V.; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. H.; BARREIRO NETO, M.; FRANCO, C. F. O. Crescimento e produção de fava em função de lâminas de irrigação e densidade de plantio. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, João Pessoa - PB, v.3, n.2, p.37-41, 2009.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- NASCIMENTO, L. R. S. **Diversidade de isolados bacterianos e sua influência na FBN em diferentes coberturas vegetais**. 2013. 109 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- NORRIS, D. O. **Some concepts and methods in sub-tropical pasture research**. London: Commonwealth Bureau of Pasture and Field Crops, 1964. (Bulletin, 47)
- OLIVEIRA, A.P.; ALVES, E.U.; ALVES, A.U.; DORNELAS, C.S.M.; SILVA, J.A.; PÔRTO, M.L.; ALVES, A.V. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. *Horticultura Brasileira*, v. 22, n. 3, p. 543-546, 2004.
- ORMEÑO, E.; TORRES, R.; MAYO, J.; RIVAS, R.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E.; ZÚNIGA, D. *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. In: VELÁZQUEZ, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. (Eds) **Developments in Plant and Soil Sciences**, Springer-Verlag, The Netherlands, p. 243-247, 2007.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; VINUESA, P.; ZUNIGA-DAVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Systematics and Applied Microbiology*, n.29, p. 253-262, 2006.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, V. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, vol. II, 1997.

ROHLF. F. J. **NTSYS - pc**, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter, 2000. Software.

SANTOS, C. E. R. E.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S.; SEIDO, S. L.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. **Modificação de vasos de Leonard com garrafas descartáveis tipo PET**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2009b. (Comunicado Técnico, 124)

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. L.; BORGES, W.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife, v.2, n.4, p.249-256, 2007.

SANTOS, D.; CORLETT, F. M. F.; MENDES, J. E. M. F.; WANDERLEY JUNIOR, J. S. A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.37, n.10, p.1407-1412, 2002.

SANTOS, J. O. **Divergência genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. 2008. 97p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Piauí, Teresina.

SANTOS, J. O.; ANTUNES, J. E. L.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. *Annals of Microbiology*, v.61, n.3, p.437-444, 2011.

SANTOS, J. O.; ARAÚJO, A. S. F.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Ontogenia da nodulação em feijão-fava (*Phaseolus lunatus*). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife - PE, v.4, n.4, p.426-429, 2009a.

SERRANO-SERRANO, M. L.; HERNÁNDEZ-TORRES, J.; CASTILLO-VILLAMIZAR, G.; DEBOUCK, D. G.; SÁNCHEZ, M. I. C. Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: Evidences for an Andean origin and past migrations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, n.54, p.76-87, 2010.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos/Faculdade de Agronomia/UFRGS, 1995.

THIES, J.E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, n.57, p.19-28, 1991.

TRIPLETT, E.W.; HEITHOLT, J.J.; EVENSEN, K.B.; BLEVINS, D.G. Increase in internode length of *Phaseolus lunatus* caused by inoculation with a nitrate reductase- deficient strain of *Rhizobium sp.* *Plant Physiology*, n.67, p.1-4, 1981.

VIEIRA, C; PAULA JÚNIOR, T. S.; BORÉM, A. **Feijão**. 2 ed. Viçosa-MG: Editora UFV, 2008.

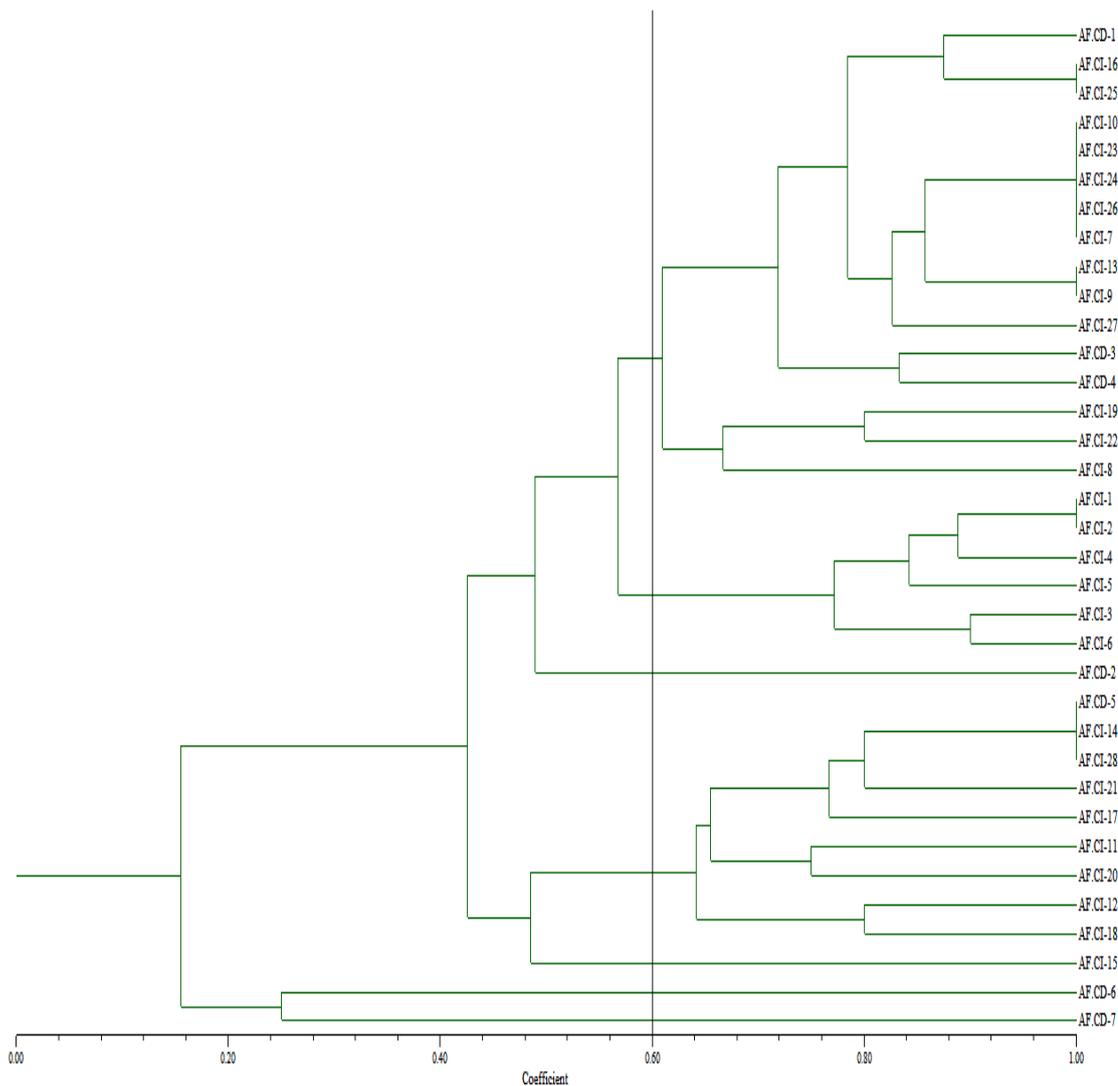
VIEIRA, R. F. **A cultura do feijão-fava**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.16, n.174, p.30-37, 1992.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Scientific Publications Oxford: Blacwell Scientific, 1970. 164p

XAVIER, G. R.; MARTINS, L.M. V.; RIBEIRO, J. R. A.; RUNJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga*, v.19, n.1. p. 25-33, 2006.

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

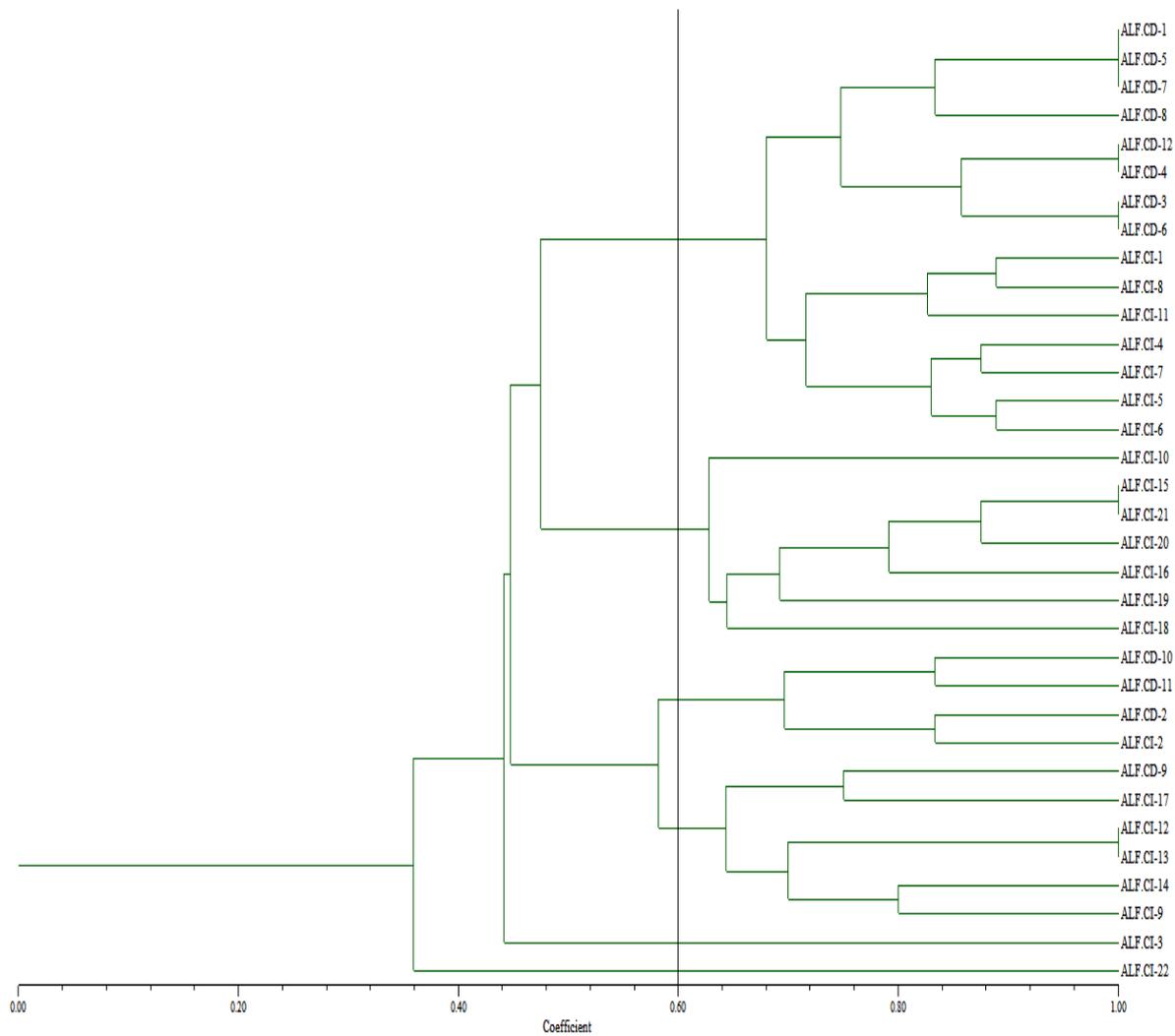
## APÊNCIDE



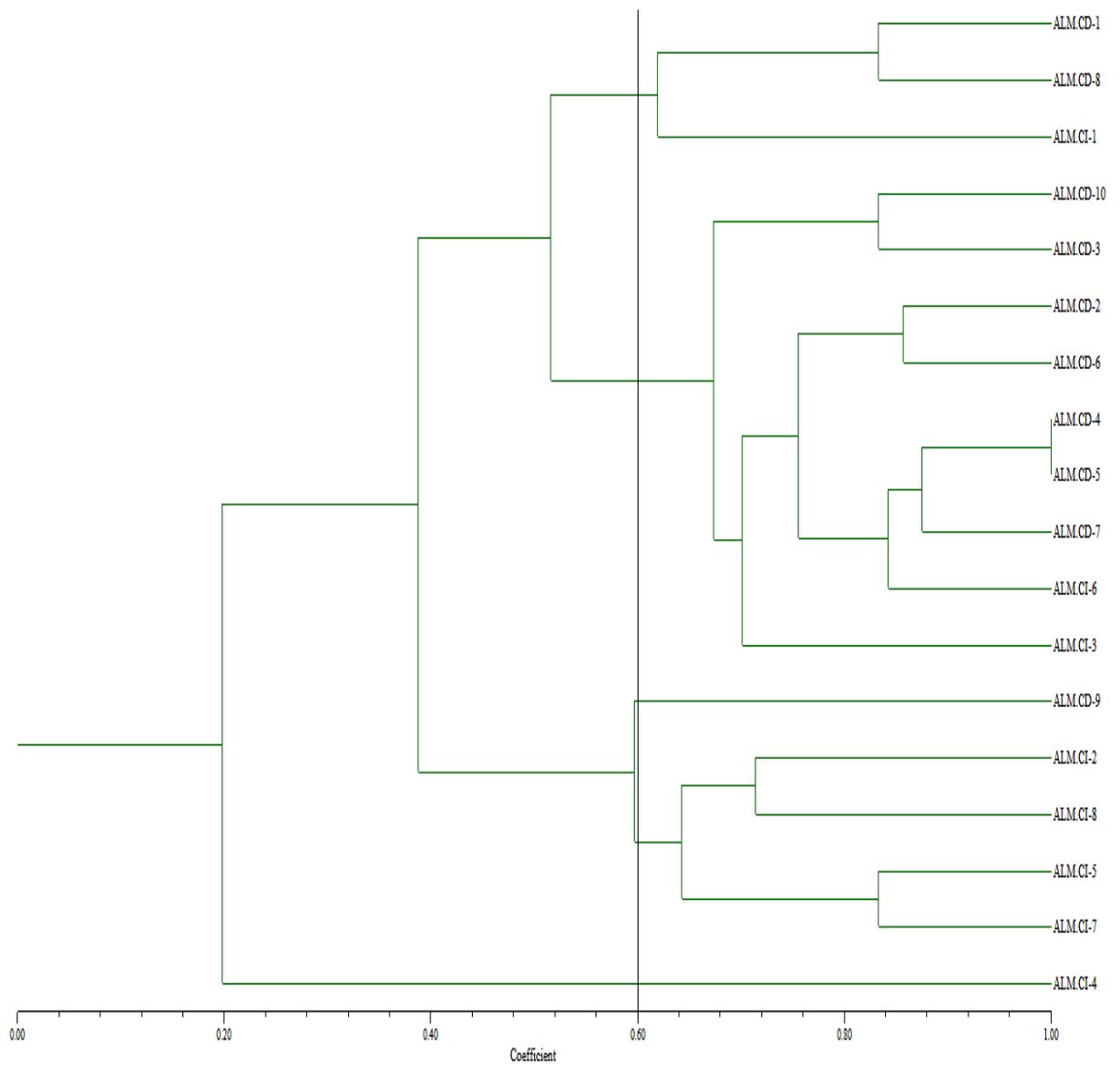
**Figura 1A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Areia-PB com cultivo de *P. vulgares*. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



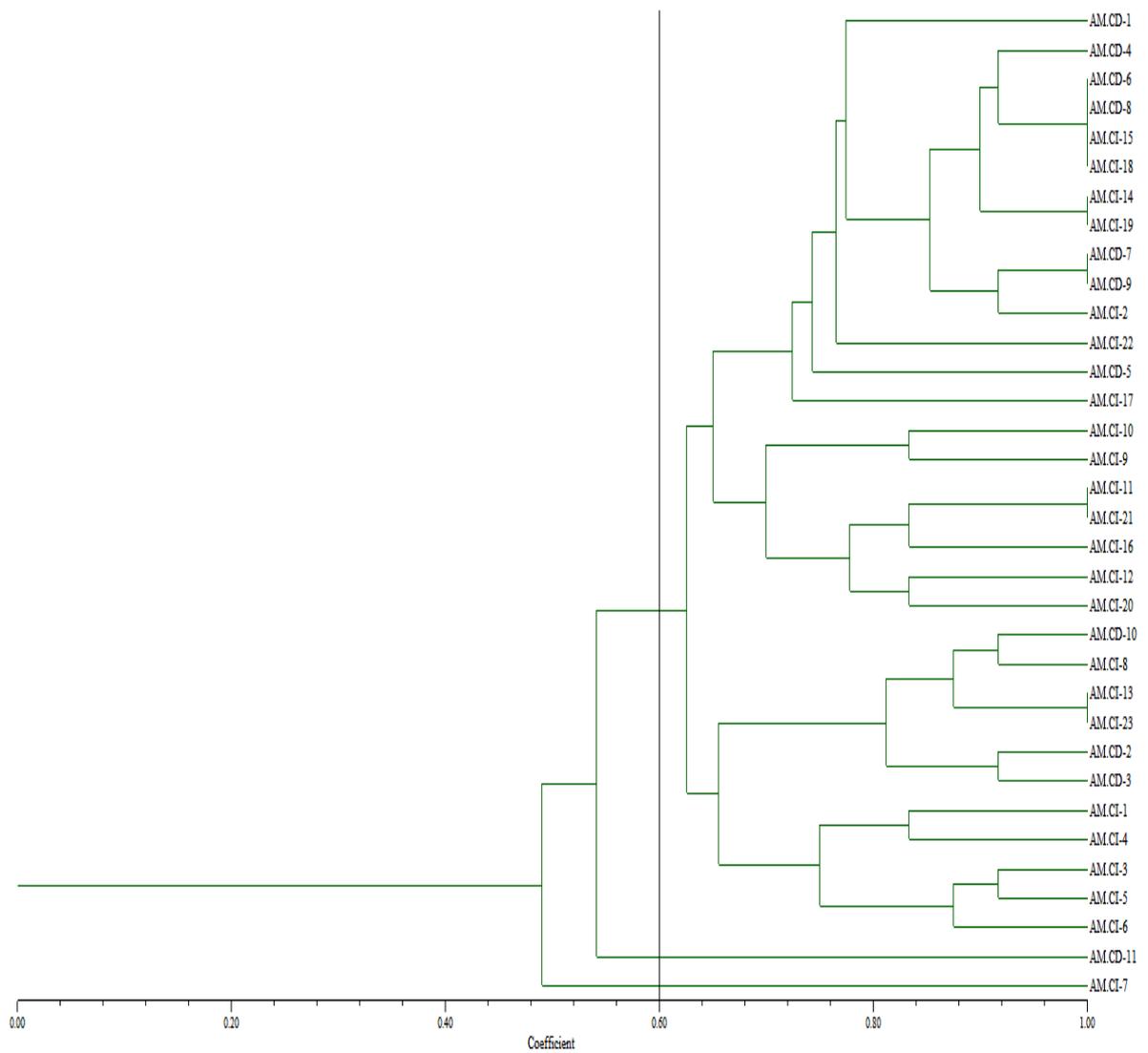
**Figura 2A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Alagoa Grande-PB com cultivo de *P. lunatus*. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



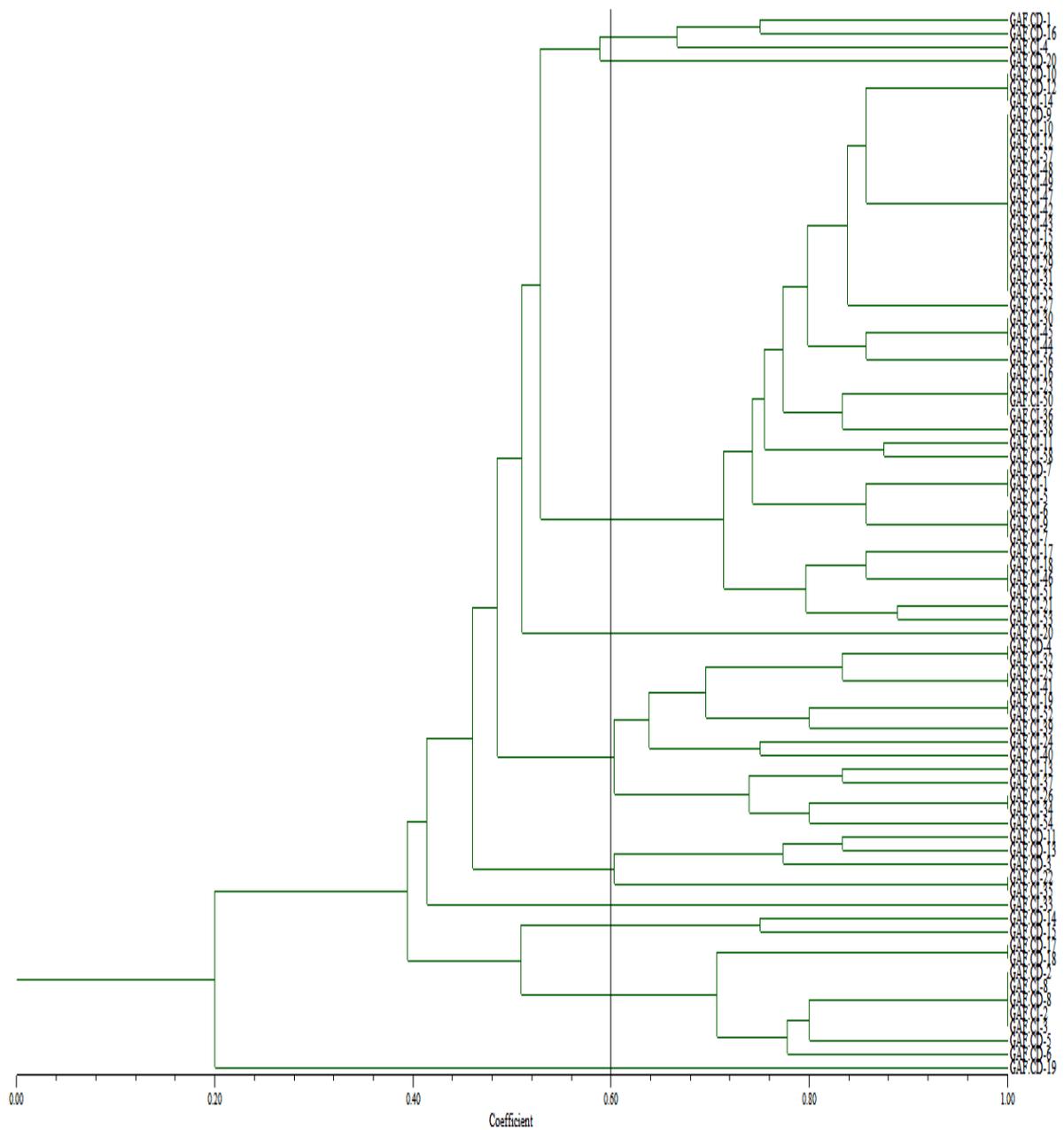
**Figura 3A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Alagoinha-PB com cultivo de *P. lunatus*. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



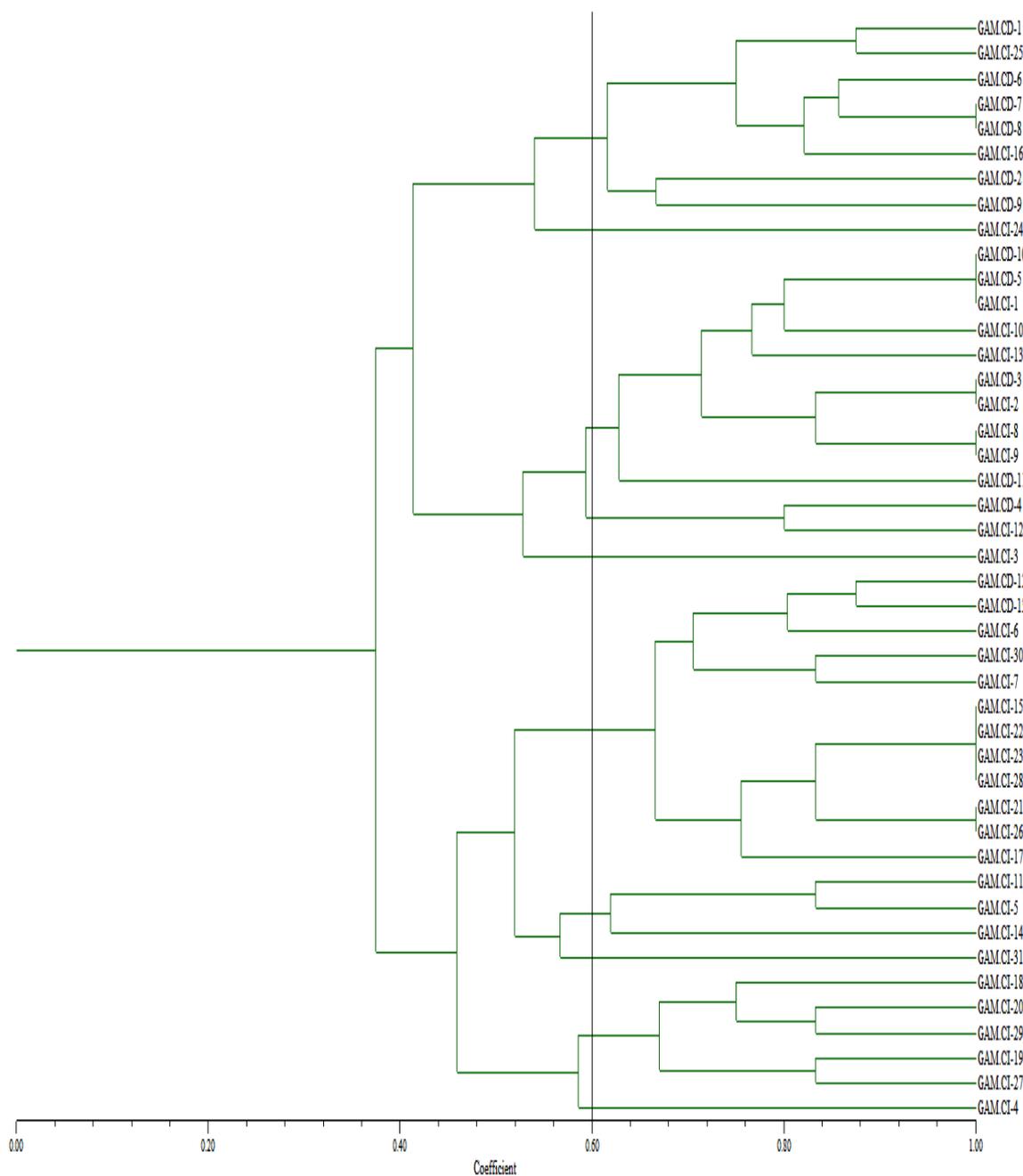
**Figura 4A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Alagoinha-PB com cobertura de vegetação nativa. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



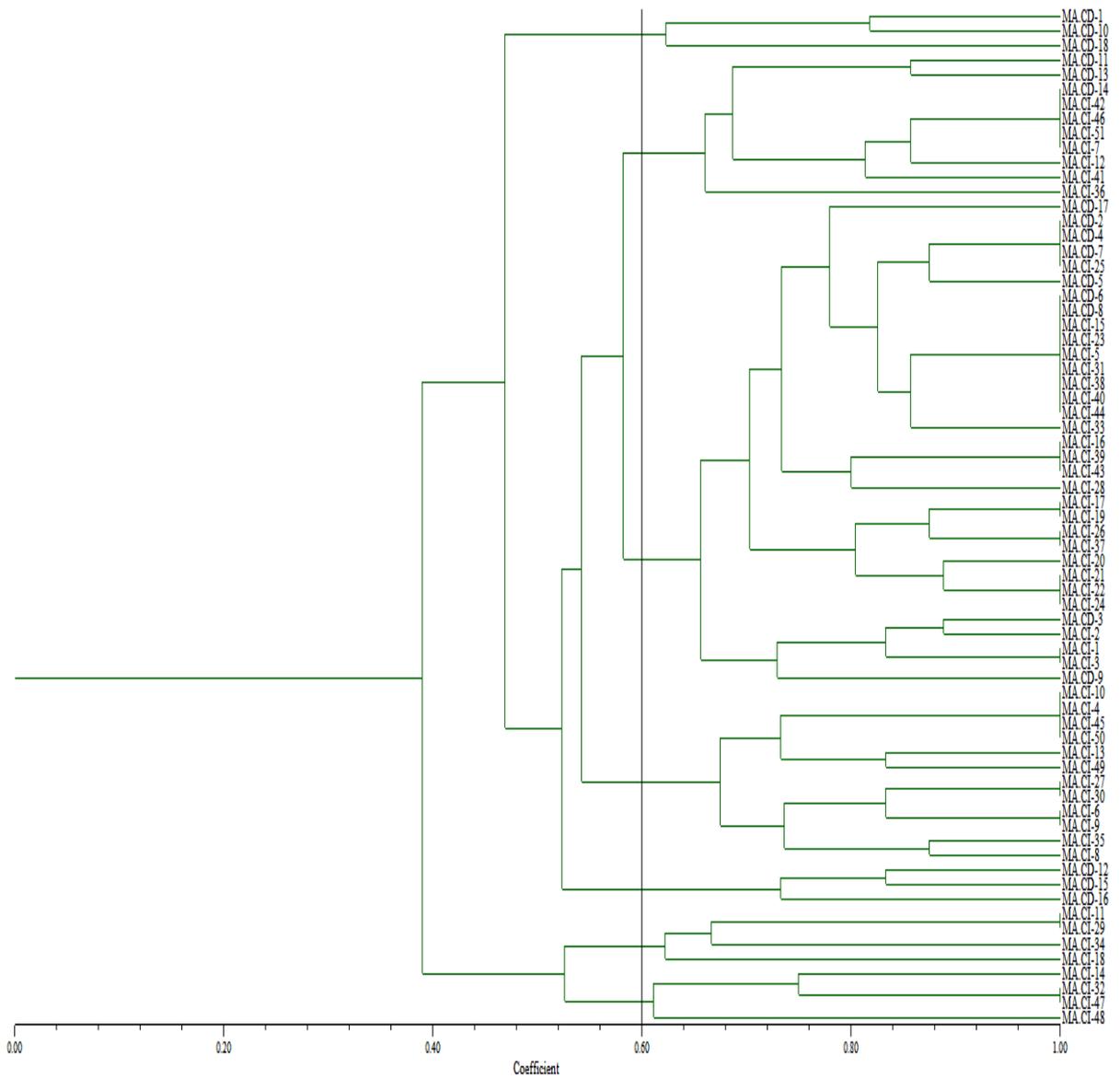
**Figura 5A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Areia-PB com cobertura de vegetação nativa. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



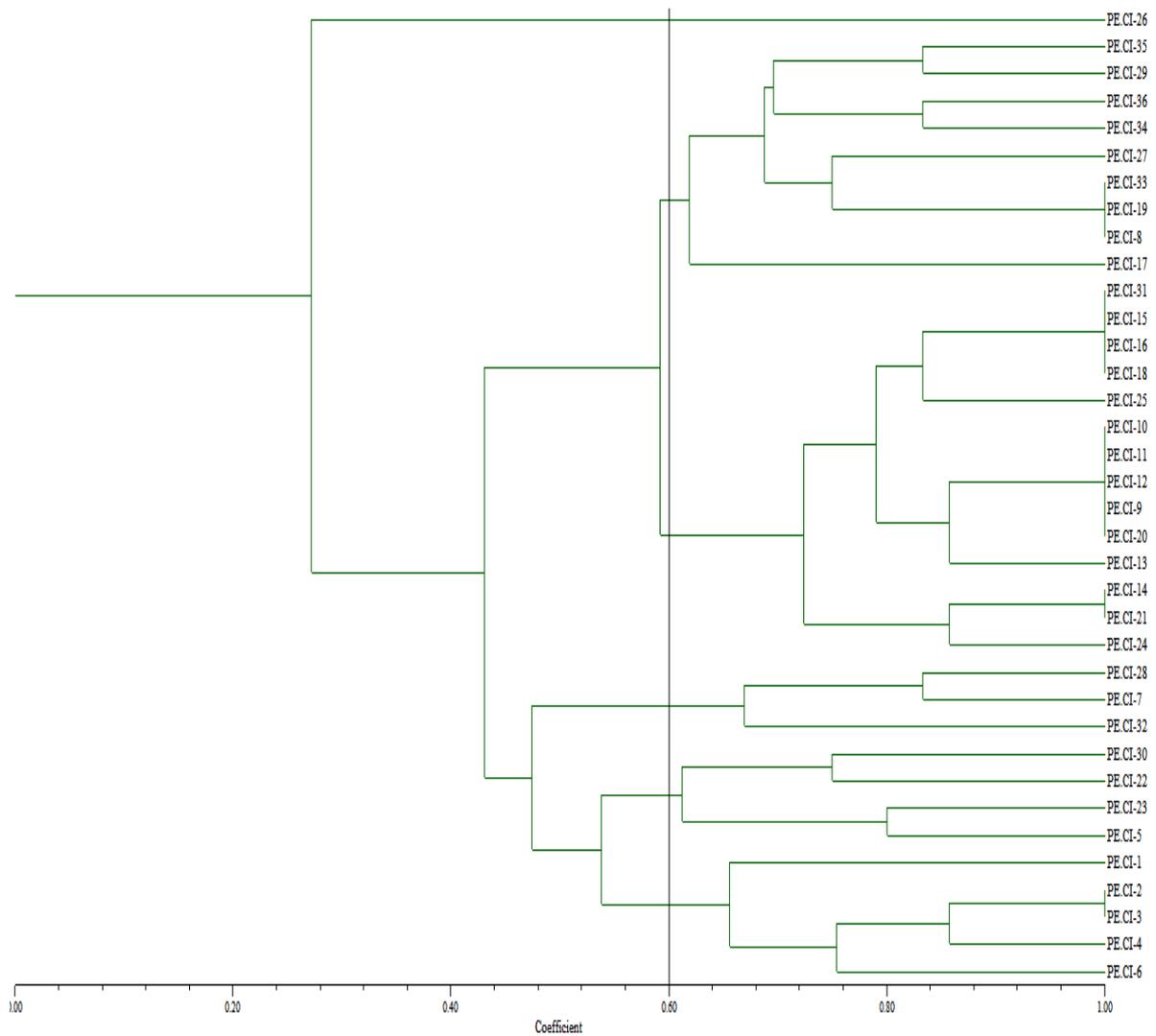
**Figura 6A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Garanhuns-PE com cultivo de *P. lunatus*. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



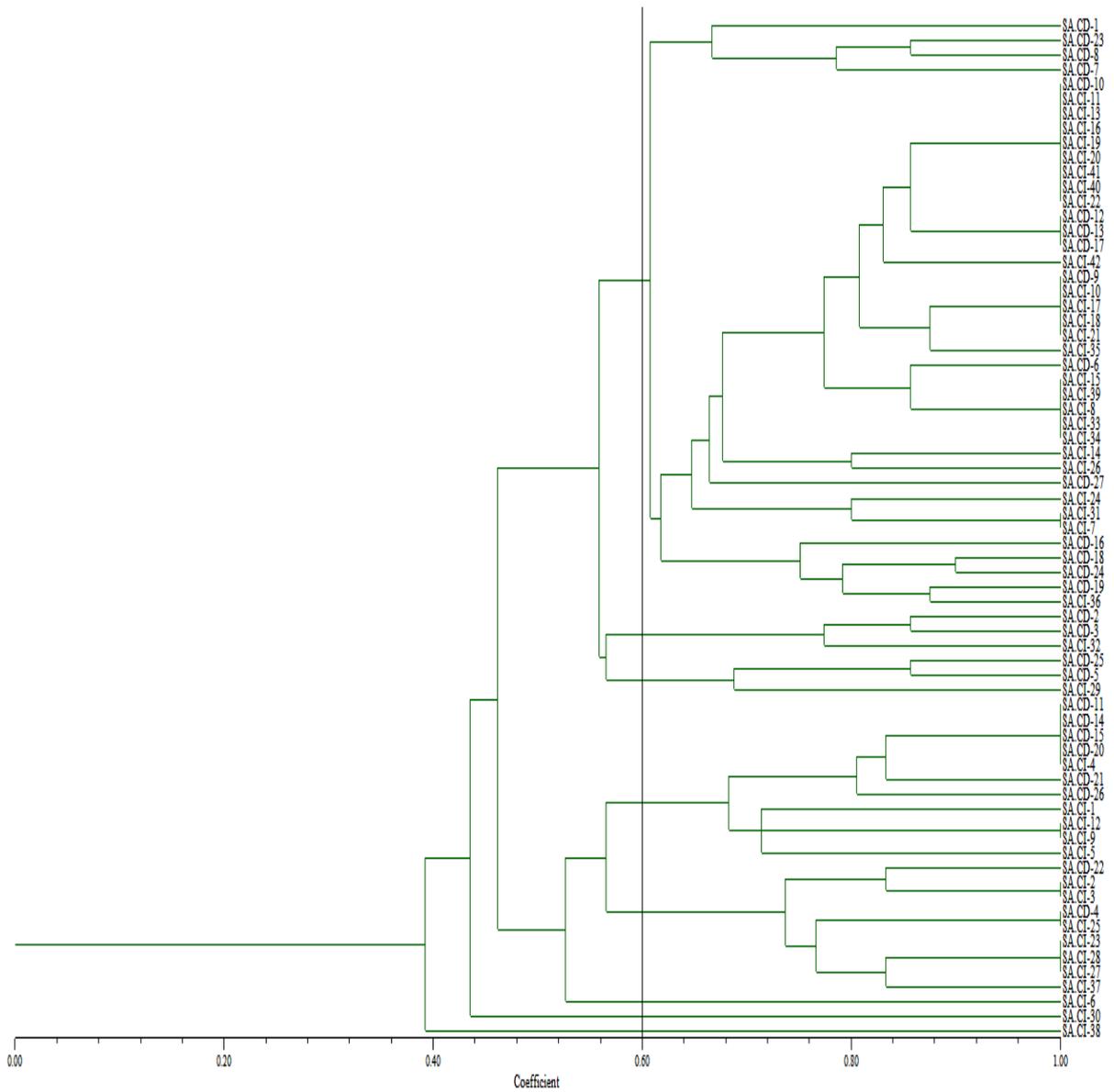
**Figura 7A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Garanhuns-PE com cobertura de vegetação nativa. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



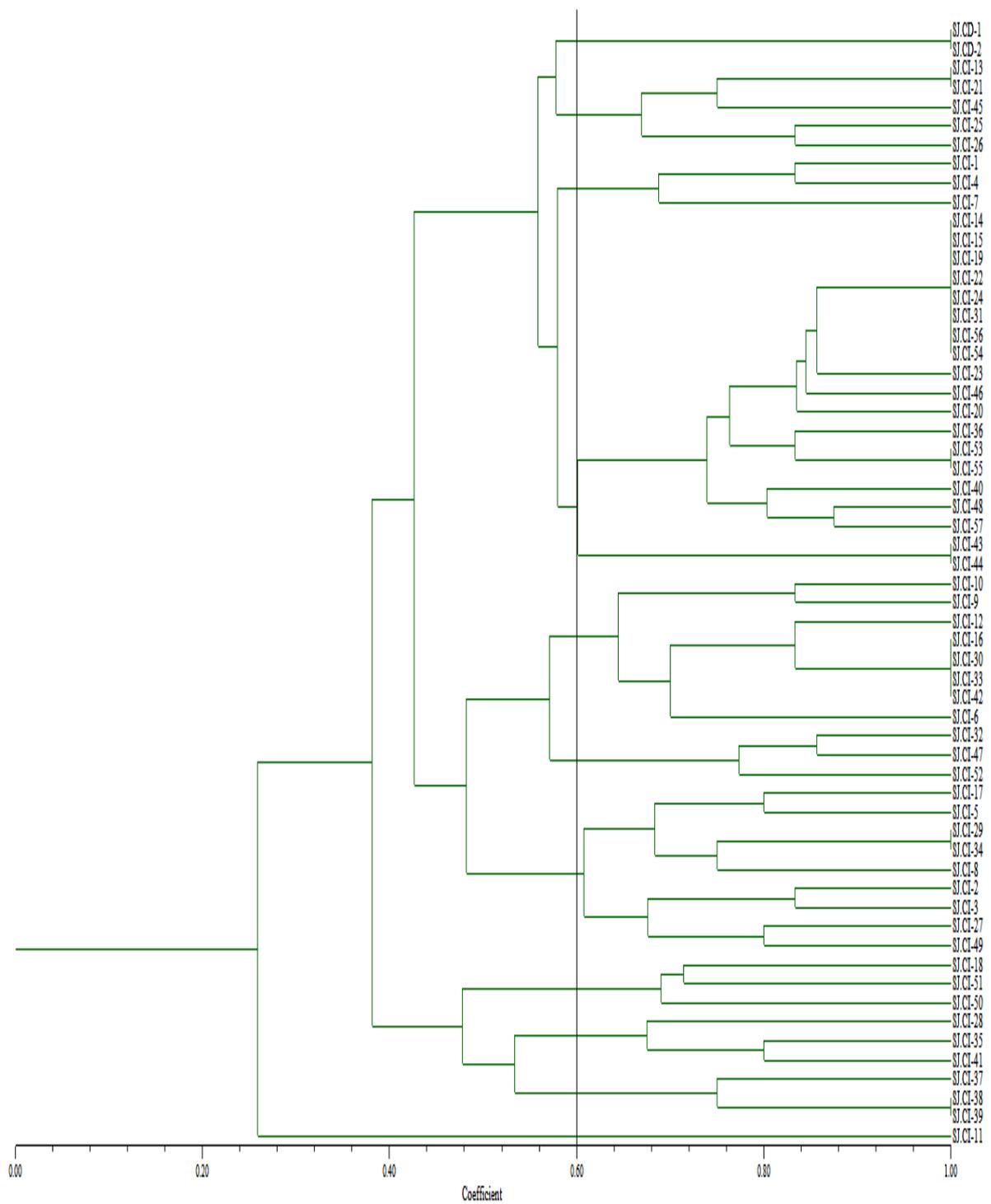
**Figura 8A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Massaranduba-PB com cultivo de *P. lunatus*. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



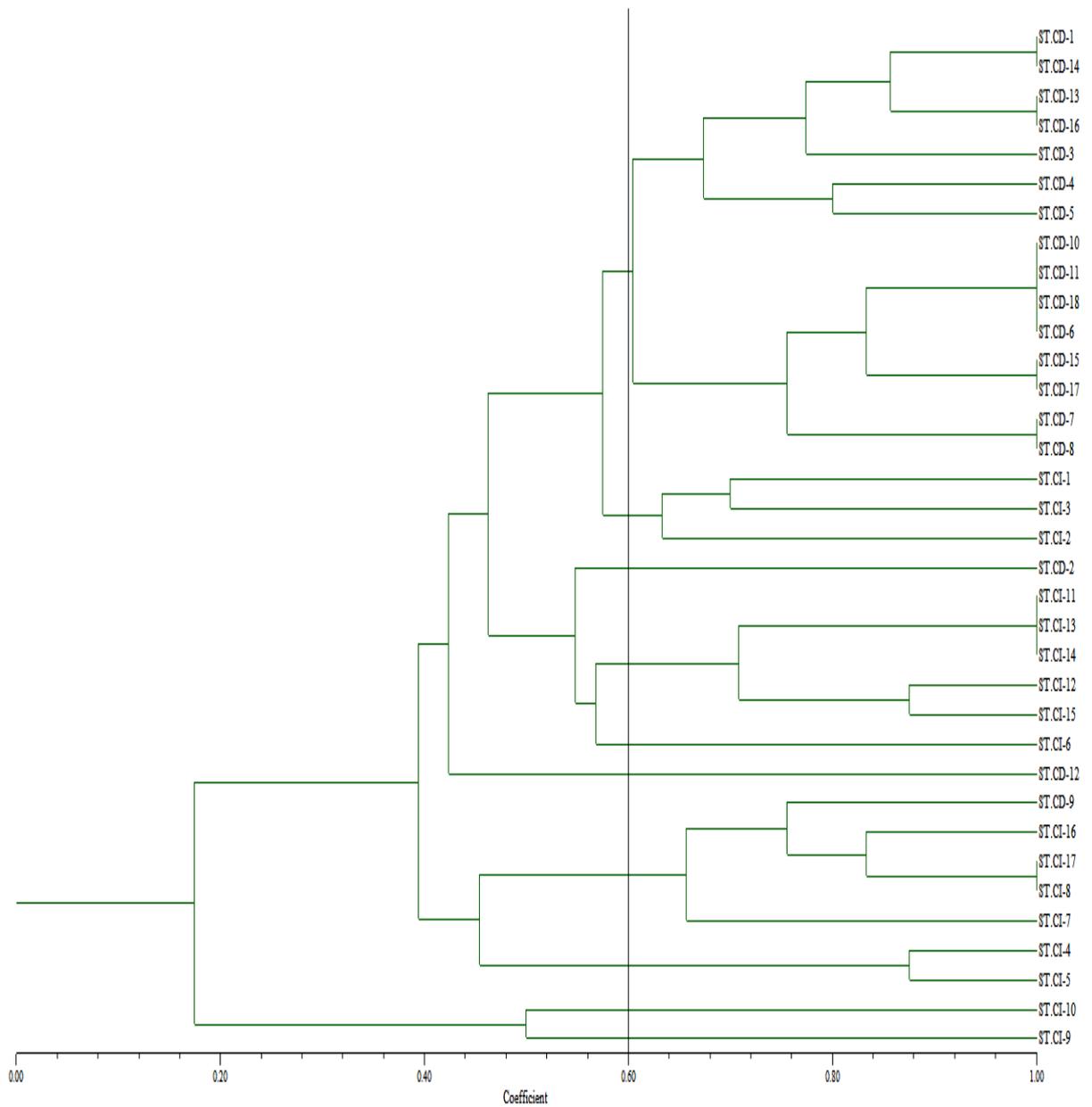
**Figura 9A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Santa Maria da Boa Vista-PE com cobertura de vegetação nativa. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



**Figura 10A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Sapé-PB com cultivo de *P. lunatus*. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



**Figura 11A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de São José do Egito-PE com cobertura de vegetação nativa. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.



**Figura 12A** - Dendrograma de similaridade construído com o índice de Jaccard e o algoritmo de UPGMA dos isolados de *P. lunatus* obtidos na amostra de Serra Talhada-PE com cobertura de vegetação nativa. Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2014.