



UFRR

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO**

CÁTIA APARECIDA MOSQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA EM FEIJÃO-CAUPI DE
ESTIRPES DE RIZÓBIO ISOLADOS DE DIFERENTES REGIÕES DE RORAIMA**

**BOA VISTA
RORAIMA - BRASIL
2014**

CÁTIA APARECIDA MOSQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA EM FEIJÃO-CAUPI DE
ESTIRPES DE RIZÓBIO ISOLADOS DE DIFERENTES REGIÕES DE RORAIMA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli

Co-orientadora: Pesquisadora Dra. Krisle da Silva

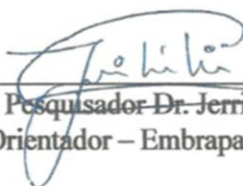
**BOA VISTA
RORAIMA - BRASIL
2014**

CÁTIA APARECIDA MOSQUEIRA

Caracterização e eficiência simbiótica em feijão-caupi de estirpes de rizóbios isolados de diferentes regiões de Roraima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal.

Aprovada: 21 de março de 2014.



Pesquisador Dr. Jerri Edson Zilli
Orientador – Embrapa Agrobiologia



Pesquisadora Dra. Krisle da Silva
Embrapa Roraima



Prof. Dr. Plínio Henrique Oliveira Gomide
UERR



Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro Rocha
UFRR

AGRADECIMENTOS

À Krisle da Silva Pesquisadora da Embrapa Roraima e ao Pesquisador Jerri Édson Zilli pela orientação na elaboração deste trabalho.

A Universidade Federal de Roraima (UFRR), ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – POSAGRO, pela oportunidade de realização do curso de mestrado e a CAPES pela bolsa concedida.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Roraima pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos os professores do Curso de Mestrado em Agronomia, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao coordenador do POSAGRO Prof. Dr. Valdinar Ferreira Melo e a secretária Elene Marçal, pelo constante auxílio.

Aos meus amigos e amigas: Aliny Maria Ribeiro de Mello, Eliane do Nascimento Cunha, Izaias França Junior, Anderson Strücker, Ismaele Breckenfeld, Joaquim Diego Silva Costa, Ricardo Martel Coffy e Luene Peixoto Pinheiro, pelo enorme carinho e apoio prestado. Em especial aos meus grandes e estimados amigos Alexandre Cardoso Baraúna, Joselma Pedrosa da Silva, Carlos Abanto, Davair Lopes Teixeira Junior e Josimar da Silva Chaves, por estarem comigo em momentos importante para realização deste trabalho.

Ao Pesquisador Dr. Oscar José Smirdele pelo incentivo e por acreditar em meu trabalho e ao analista da Embrapa Roraima Alex Miranda, pelo apoio na realização das análises relacionadas a este trabalho.

Aos trabalhadores do campo experimental Água Boa da Embrapa Roraima pelo apoio na condução dos experimentos.

A meu esposo Valdomiro Paulo Berté, pelo incentivo dado a mim desde o início dos estudos, até o presente.

Aos membros da banca, Dra. Krisle da Silva, Dr. Plínio Henrique Oliveira Gomide e ao Dr. Paulo Roberto Ribeiro Rocha, pelo aceite do convite e pelas contribuições ao trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, tenham contribuído para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos!!!!

BIOGRAFIA

Cátia Aparecida Mosqueira Filha de Mirian Gonsalves de Paula e Valmir Mosqueira nasceu em Corumbá, Mato Grosso do Sul em 17 de março de 1985. Mudou-se para Jacareí (SP) em 2004, onde morou por 5 anos. Dando início ao curso de Engenharia Ambiental na Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) durante 3 anos letivos. Mudou-se para Boa Vista Roraima em 2009, ingressando no curso de Agronomia na Faculdade Roraimense de Ensino Superior (FARES). Durante a graduação exerceu atividades de pesquisa como bolsista de iniciação científica no laboratório de microbiologia da Embrapa Roraima, sob responsabilidade do pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli. Onde participou de projeto de pesquisa através do programa de iniciação científica- IC (CNPq). Foi orientada pela pesquisadora Dra. Krisle da Silva. Trabalhando com Seleção de estirpes de rizóbios para a cultura do feijão-caupi com elevada eficiência no processo de fixação do nitrogênio e competitivas para a recomendação na Região Norte. Concluiu o curso de bacharelado em Agronomia em dezembro de 2011. Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Agronomia (POSAGRO), área de concentração em Produção Vegetal em 2012, da Universidade Federal de Roraima. Desenvolvendo o seu trabalho junto ao laboratório de Microbiologia do solo na Embrapa Roraima. Sob orientação do pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli, submetendo-se a defesa de dissertação em 21 de Março de 2014 tendo como título: **Caracterização e eficiência simbiótica em feijão-caupi de estirpes de rizóbio isolados de diferentes regiões de Roraima.**

MOSQUEIRA, Cátia Aparecida. **Caracterização e eficiência simbiótica em feijão-caupi de estirpes de rizóbio isolados de diferentes regiões de Roraima.** 2014, 62 p. Dissertação de mestrado/Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2014.

RESUMO

O feijão-caupi constitui-se uma das leguminosas de grande importância para o Estado de Roraima e seu cultivo pode ser encontrado em diversas áreas da região. É uma leguminosa que pode beneficiar da fixação biológica de nitrogênio, através da simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Desta forma, objetivou-se neste trabalho caracterizar e avaliar a eficiência simbiótica de 41 estirpes de rizóbios isoladas de ambientes de mata e cerrado em Roraima. As estirpes foram caracterizadas morfológicamente e agrupadas de acordo com os perfis gerados, em seguida foram caracterizadas geneticamente através da amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA*. Utilizando o feijão-caupi como planta isca, foi conduzido um experimento em casa de vegetação para avaliação da eficiência simbiótica, do qual determinou-se a matéria seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos. Deste experimento, oito estirpes que se mostraram mais eficientes foram testadas em campo. No campo dois experimentos foram conduzidos, um em área sem cultivo anterior com feijão-caupi e outro em área cultivada por dois anos. Dos experimentos de campo, aos 30 dias foram avaliados, massa seca e N-total da parte aérea, número e massa seca de nódulos e no final do ciclo determinou-se a produtividade de grãos. Do total de estirpes caracterizadas, a maioria apresentou crescimento lento (58%) e reação neutra (51 %) do meio de cultura, características que foram compatíveis com as do gênero *Bradyrhizobium*. A análise do sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA* revelou que as estirpes obtidas de feijão-caupi apresentam elevada diversidade fenotípica e genotípica, com predominância de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* e em menor proporção estirpes com características semelhantes ao gênero *Rhizobium*. Os resultados obtidos no ensaio de eficiência simbiótica mostrou que 20 estirpes foram eficientes, sendo todas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Três estirpes (ERR 24, ERR40 e ERR 510) apresentam bons resultados para os atributos avaliados em condições de campo, apresentando valores satisfatórios quanto à eficiência simbiótica igual ou superior as estirpes atualmente recomendadas e ao controle nitrogenado, sendo indicadas como novos inoculantes.

Palavras-Chave: Fixação Biológica de Nitrogênio. Caracterização Genética. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Rizóbios.

MOSQUEIRA, Cátia Aparecida. **Characterization and symbiotic efficiency in cowpea of strains of rhizobia isolated from different regions of Roraima.** 2014, 62 pages. Master of Science Dissertation in Agronomy – Roraima Federal University (Universidade Federal de Roraima), Boa Vista, 2014.

ABSTRACT

The cowpea constitutes one of the legume plants of great importance to the State of Roraima and its cropping can be found in several areas of the region. It is a legume plant which can benefit from the biological fixation through symbiosis with bacteria of the genus *Bradyrhizobium*. In this way, it was aimed in this work to characterize and evaluate the symbiotic efficiency of strains of rhizobia isolated from Forest and cerrado (savannah-like vegetation) environment in Roraima. The strains were characterized morphologically and grouped together according to the profiles generated; next, they were characterized genetically through the amplification and partial sequencing of gene 16S *rRNA*. Utilizing the cowpea as a bait plant, an experiment was conducted in a greenhouse for evaluating of the symbiotic efficiency, from which the dry matter of the shoot, number and dry matter of nodules were determined. Of this experiment, eight strains which proved more efficient were tested in field. In the field, two experiments were conducted, one in an area with no previous cropping with cowpea and the other in an area cultivated for two years. Of the Field experiments, at 30 days, dry matter and total-N of the shoot, number and dry mass of nodules were evaluated and at the end of the cycle, grain yield was determined. Of the total of strains characterized, most of them presented slow growth (58%) and neutral reaction (51 %) of the culture medium, characteristics which were consistent with those of the genus *Bradyrhizobium*. The analysis of the partial sequencing of gene 16S *rRNA* revealed that the strains obtained of cowpea present a high phenotypic and genotypic diversity, with predominance of strains of the genus *Bradyrhizobium* ADN to a smaller extent strains with characteristics similar to the genus *Rhizobium*. The results obtained in the symbiotic efficiency assay showed that 20 strains were efficient, all of them belonging to the genus *Bradyrhizobium*. Three strains (ERR 24, ERR40 and ERR 510) present good results as regards the symbiotic efficiency for the attributes evaluated under field conditions, presenting satisfactory values concerning the symbiotic efficiency equal or superior to the strains

currently recommended and to the nitrogen-containing control, they being recommend as new inoculants.

Key words: Biological fixation of nitrogen. Genetic characterization. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Rhizobia*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Feijão-caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.].....	15
2.2	Fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi.....	16
2.3	Fatores limitantes a fixação biológica de nitrogênio (FBN).....	18
2.4	Seleção de estirpes de rizóbios.....	19
2.5	Caracterização de rizóbios.....	20
3.	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral.....	22
3.2	Objetivos específicos.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Origem das bactérias.....	23
4.2	Caracterização morfológica cultural.....	25
4.3	Caracterização Genotípica	25
4.3.1	Extração de DNA	25
4.3.2	Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S <i>rRNA</i>	26
4.4	Eficiência das estirpes em casa de vegetação e campo	26
4.4.1	Eficiência simbiótica em casa de vegetação.....	27
4.4.2	Experimento em campo.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Caracterização morfológica cultural.....	30
5.2	Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S <i>rRNA</i>	34
5.3	Eficiência simbiótica em casa de vegetação.....	37
5.4	Avaliações do experimento em campo.....	41
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	APÊNDICE	55
	ANEXO	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Croqui da área experimento feijão-caupi com estirpes nativas isoladas do solo de Roraima.....	55
Figura 2	Dendrograma de similaridade formado pelo (algoritmo UPGMA e coeficiente de jaccard) de bactérias que nodulam o feijão-caupi coletadas em área de mata e cerrado do Estado de Roraima.....	32
Figura 3A	Distribuição em porcentagem quanto ao tempo de crescimento em meio com extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) de estirpes obtidas de amostras de solo coletadas nas áreas de cerrado e mata do Estado de Roraima.....	33
Figura 3B	Distribuição em porcentagem quanto ao pH em meio com extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) de estirpes obtidas de amostras de solo coletadas nas áreas de cerrado e mata do Estado de Roraima.....	33
Figura 4A	Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S <i>rRNA</i> das estirpes obtidos em solos de mata e cerrado em Roraima e estirpes tipo dos gênero <i>Bradyrhizobium</i> , obtidas no Genbank.....	36
Figura 4B	Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S <i>rRNA</i> de estirpes obtidas em solos de mata e cerrado do estado de Roraima e estirpes tipo dos gênero <i>Rhizobium</i> , obtidas no Genbank.....	37
Figura 5	Experimento em casa de vegetação, comparação do desenvolvimento das plântulas inoculadas com BR 3262 e BR 3267; Nitrogenada (N), controle planta s/inoculação (C) e planta inoculada com estirpes isolada de ambiente de mata em Roraima (ERR 24).....	57
Figura 6A e B	Estirpes coletadas de ambiente de mata e cerrado em Roraima, crescidas em meio de cultura YMA, estirpe ERR 42 (A) com pH neutro do meio e moderada produção de muco; estirpe ERR 41 (B) com pH ácido do meio e abundante produção de muco.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Local de coletas do solo para cultivo de feijão-caupi como planta-isca e atributos químicos das respectivas amostras de solo.....	24
Tabela 2	Composição da solução de Hoagland e Arnon com adaptação utilizada para irrigar os tratamentos do ensaio de eficiência dos rizóbios em plantas de feijão-caupi.....	62
Tabela 3	Resultado da análise química e física do solo das áreas de (primeiro cultivo e área já cultivada) antes da implantação dos experimentos no campo experimental Água Boa.....	28
Tabela 4	Características morfológicas de estirpes isoladas de solos de Roraima capazes de nodular feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> [L.] Walp.).....	56
Tabela 5	Sequências de estirpes depositadas no GenBank utilizadas para análise filogenética dos rizóbios isolados de feijão-caupi.....	60
Tabela 6	Avaliação de parâmetros de desenvolvimento vegetal obtidos de feijão caupi inoculados com estirpes nativas isoladas de ambiente de mata e cerrado em Roraima.....	40
Tabela 7	Médias da massa seca da parte área, número e massa seca de nódulos secos, nitrogênio total e produtividade de feijão-caupi em experimento conduzido em área de primeiro cultivo no campo experimental Água Boa. Embrapa Roraima.....	42
Tabela 8	Médias da massa seca da parte área, número e massa seca de nódulos secos, nitrogênio total e produtividade de feijão-caupi em experimento conduzido em área cultivada no campo experimental Água Boa. Embrapa Roraima.....	44
Tabela 9	Resumo da ANAVA para as variáveis MSPA: matéria seca da parte aérea; NN: número de nódulos; MSN: matéria seca de nódulos; NT: nitrogênio total e Produtividade (Prod.) Área nova.....	59
Tabela 10	Resumo da ANAVA para as variáveis MSPA: matéria seca da parte aérea; NN: número de nódulos; MSN: matéria seca de nódulos; NT: nitrogênio total e Produtividade (Prod.) Área cultivada.....	59

1 INTRODUÇÃO

A utilização de insumos biológicos na agricultura atual como alternativa a substituição aos insumos químicos para suprimento de nutrientes as plantas tem sido constante e necessário. Neste contexto a fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem se apresentado como um processo importantíssimo para sustentabilidade da agricultura brasileira, suprimindo as culturas com N a baixo custo econômico e redução dos impactos ambientais (HUNGRIA et al., 2007). O qual tem sido frequentemente demonstrado como uma importante via de entrada de nitrogênio em solos agrícolas, além disso, tem contribuído para o aumento do rendimento de grãos e na substituição dos adubos nitrogenados, fazendo com que o custo da produção seja mais acessível (SOARES et al., 2006).

O nitrogênio (N) desempenha papel importante no crescimento e na produção de grãos, sendo considerado um dos elementos essencial para a agricultura nas regiões de clima tropical (FRANCO e BALEIRO, 1999). Apesar de compor 80% dos gases da atmosfera, poucos organismos conseguem utilizá-lo. Bactérias chamadas fixadoras de N_2 são capazes de transformar o N_2 em amônia (NH_3), forma utilizada pelas plantas. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural mediado por procariotos, os quais, em simbiose com um hospedeiro (planta leguminosa) fornecem nitrogênio a planta e esta, em contrapartida, a supre em carboidratos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Sendo assim, o interesse pelo conhecimento das características dos microrganismos existentes nos solos da região Amazônica tem sido crescente, uma vez que ela concentra uma grande diversidade de espécies vegetais e pesquisas também tem demonstrado uma grande diversidade de bactérias diazotróficas (LIMA et al., 2005). No entanto, devido sua extensão ainda são poucos os estudos desenvolvidos acerca da diversidade de bactérias que nodulam leguminosas de importância agrônômica. Particularmente, no Estado de Roraima, que apresenta ambientes bem distintos de outras áreas da região Amazônica, como por exemplo, fitofisionomia, pouco se conhece da diversidade de rizóbios capazes de nodular o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

O feijão-caupi é um dos principais componente da dieta alimentar das populações das regiões Nordeste e Norte do Brasil (ZILLI; VILARINHO; ALVES, 2009), sendo bastante consumido no Estado de Roraima tanto na forma de grão seco como de vagem verde. É uma cultura de importância agrícola, principalmente para os pequenos agricultores que vendem os excedentes nas feiras livres e mercados da Capital. Além disso, o feijão-caupi adapta-se bem a

quase todos os tipos de solos, inclusive os arenosos e de baixa fertilidade natural. Apresenta ciclo curto e excelente capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, através da simbiose com bactérias genericamente conhecidas como rizóbio (ZILLI et al., 2009.; GUEDES et al., 2010.; ALMEIDA et al., 2010.; COSTA et al., 2010).

Apesar de sua grande importância para o desenvolvimento agrícola, o processo de FBN na cultura do feijão-caupi ainda é pouco explorado, fato que tem sido relacionado com o baixo nível tecnológico oferecido à cultura, ou pelos cultivos na maioria das vezes serem de subsistência e, ainda, pela facilidade dessa cultura nodular com bactérias do grupo rizóbio (ZILLI; VILARINHO; ALVES, 2009).

O uso de inoculantes com bactérias eficientes na FBN em condições de campo tem se mostrado uma estratégia importante visando o aumento da produtividade do feijão-caupi, sendo atualmente recomendadas quatro estirpes (BR 3262; BR3267; INPA3-11B e UFLA3-84), todas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (BRASIL, 2011), para as quais já se mostrou alta eficiência na FBN. Entretanto por ser uma leguminosa com capacidade de nodular com diferentes espécies de rizóbio (conhecida como planta promíscua) frequentemente observa-se casos de insucesso da inoculação com as estirpes recomendadas, isto porque a planta consegue nodular com diferentes grupos de rizóbios nativos presentes nos solos.

Desta forma, para que a fixação do nitrogênio seja eficaz no sistema rizóbio leguminosa é indispensável à seleção de rizóbios eficientes, bem como (PELCZAR et al., 2005) o conhecimento da diversidade e eficiência das bactérias estabelecidas no solo. Sendo assim, justifica-se a necessidade de estudos voltados ao conhecimento da diversidade, seleção e caracterização, associado ao estudo de estratégias para avaliar a composição e a contribuição de bactérias nativas do solo onde se pretende introduzir o inoculante (FERREIRA et al., 2011).

Desse modo, objetivou-se no presente trabalho caracterizar e avaliar as estirpes isoladas de áreas de mata e cerrado do Estado de Roraima quanto sua capacidade de fixar nitrogênio nas condições de clima e solo de Roraima, bem como conhecer suas características genotípicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

O feijão-caupi encontra-se distribuído em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo, com destaque para o continente africano como maior produtor. Atualmente a área total ocupada por esta cultura, no mundo, está em torno de 14,5 milhões de hectares (FAO, 2013).

No Brasil a introdução do feijão-caupi ocorreu pelos colonizadores portugueses e seus escravos africanos, a partir do século XVII, principalmente nas regiões tropicais, onde encontrou características favoráveis ao seu desenvolvimento (ALVES et al., 2009). Já na região Amazônica se deu pelos imigrantes nordestinos, que colonizaram a região a partir do século XVIII (FILGUEIRAS et al., 2009).

Segundo dados da FAO (2013), a Nigéria ocupa a primeira posição entre os maiores produtores mundiais de feijão-caupi, seguido do Níger e Burkina Faso. No entanto, como o Brasil não fornece dados estatísticos que separem feijão-caupi e feijão-comum, as estimativas da área cultivada são limitadas. De acordo com os dados da CONAB. (2014), a produção estimada nas safras de 2013/14 foram de 3.311, 2 mil toneladas, considerando todos os feijões produzidos no Brasil. Sendo os Estados Norte/Nordeste e o Centro-Sul, com maior produção. Apesar da grande importância do feijão-caupi para alguns estados brasileiros, estimativas a cerca da produtividade do caupi no Brasil é difícil, pois o feijão mais consumido no Brasil é o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

Também conhecido como feijão regional em Roraima, o feijão-caupi desempenha importante papel na produção agrícola do Estado, com produtividade média de 670 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2012). Nesta região, o feijão-caupi se destaca como cultura adaptada e de importância socioeconômica, pois se trata de um dos alimentos básicos da população Roraimense, onde é consumido na forma de grãos secos ou verdes. Além disso, é plantado em quase todos os municípios do Estado, principalmente em pequenas áreas sob diferentes sistemas de produção e, quase sempre, sem muito emprego das tecnologias disponíveis para a cultura (MENEZES et al., 2007).

É uma cultura de grandes atributos, devido suas excelentes características e rusticidade (ZILLI; VILARINHO; ALVES, 2009). Além disso, possui a capacidade de nodular de forma eficiente com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (ALMEIDA et al., 2010), processo que

tem reduzido os custos da produção com uma quantidade fixada de N_2 necessária para seu desenvolvimento.

2.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em feijão-caupi

A interação entre planta de feijão-caupi e bactérias fixadoras de nitrogênio é um exemplo de associação biológica amplamente estudada, onde seus benefícios para o sustento do meio agrícola são reconhecidos através do processo de (FBN) (SILVA et al., 2012). Processo que tem contribuído para redução dos custos de produção e independência do agricultor por insumos industrializados.

As bactérias que fazem simbiose com leguminosas (feijão-caupi, entre outras), são conhecidas como diazotróficas. Essas bactérias associam-se às raízes das plantas e reduzem o N_2 em amônia (NH_3), tornando-o disponível para o hospedeiro. É uma relação considerada evoluída, onde as bactérias fornecem o nitrogênio para a síntese proteica e a planta fornece fontes de energia para o metabolismo bacteriano, o qual resulta na formação de estruturas chamadas de nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essas estruturas são formadas através da entrada dos microrganismos (rizóbios) nas raízes das plantas e seu desenvolvimento inicia-se por meio de trocas de sinais químicos moleculares entre o hospedeiro e a bactéria (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994).

Estima-se que a (FBN) contribua com feijão-caupi com cerca de 40 a 90% do total de N acumulado pela cultura (SILVA et al., 2006; RUMJANEK et al., 2005), com uma quantidade de nitrogênio fixada entre 73 e 240 kg. ha⁻¹ ano (SOARES et al., 2007). De fato, tais benefícios gerados através da FBN para o feijão-caupi têm contribuído para substituição do uso de adubos nitrogenados pela cultura (COSTA et al., 2006).

Neste sentido a avaliação da contribuição da FBN através da inoculação de sementes de feijão-caupi é amplamente estudada em varias regiões do Brasil, como exemplo temos, a prática em ensaio de campo em Minas Gerais onde foi verificado que as estirpes, INPA3-11B (BR 3301) e UFLA03-84 (BR 3302) contribuíram de forma significativa para o aumento no rendimento de grãos de feijão-caupi, comparado às plantas não inoculadas e sem nitrogênio mineral (LACERDA et al., 2004.; SOARES et al., 2006).

Resultados positivos também foram observados no Cerrado do Estado do Piauí, com as estirpes BR3262, BR3280 (caracterizadas como *B. elkanii*) e BR3267, BR3287 e BR3288

(*Bradyrhizobium* sp.) as quais mostraram ser eficientes na fixação quanto na ocupação nodular (ZILLI et al., 2006).

Trabalhos realizados por ZILLI et al. (2009) em ambientes de cerrado e mata alterada no Estado de Roraima, demonstraram que a estirpe BR 3262 foi mais eficiente na fixação de N no feijão-caupi, apresentando resultados satisfatórios para rendimento de grãos (na média geral cerca de 1700 kg.ha⁻¹), superior aos demais tratamentos (ZILLI et al., 2009). Segundo Melo e Zilli. (2009) ao estudar a fixação biológica de N em cultivares de feijão-caupi recomendadas para diferentes condições ambientais em Roraima, verificaram que a BR 3262 também proporcionou maior incremento no número e na massa de matéria seca de nódulos, em comparação aos demais tratamentos.

Atualmente, existem 14 gêneros indicados como simbiote que nodulam leguminosas, como *Rhizobium* (FRANK, 1889), *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982), *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Ensifer* (CHEN et al., 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Allorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1998), *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001), *Methylobacterium* (SY et al., 2001), *Devosia* (RIVAS et al., 2002), *Ralstonia/Cupriavidus* (CHEN et al., 2001), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005), *Herbaspirillum* (VALVERDE et al., 2003) e ainda *Aminobacter* (MAYNAUD et al., 2012) e *Microvirga* (ARDLEY et al., 2012).

A relação simbiótica do feijão-caupi e grupos de rizóbios é frequentemente relatada como sendo de baixa especificidade, devido ao grande potencial dessa leguminosa em nodular com diferentes espécies de bactérias do grupo rizóbio (JARAMILLO et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2012). No entanto, apesar dos diversos gêneros indicados como simbiotes para o feijão-caupi, o mais comum associado a este hospedeiro é o *Bradyrhizobium* (ZILLI et al., 2009). Apesar de ser considerado de baixa especificidade, por nodular facilmente com os rizóbios presentes no solo, alguns trabalhos tem mostrado que quando inoculado com estirpes selecionada do gênero *Bradyrhizobium* o feijão-caupi pode responder bem, inclusive com aumento na produtividade (GUALTER et al., 2011). De acordo com Melo (2009), o feijão-caupi ao ser inoculado com estirpes selecionadas pode resultar em produtividades iguais ou superiores, quando confrontadas a adição de fertilizantes nitrogenados.

Contudo, no Brasil essa prática principalmente na cultura do feijão-caupi ainda não é comum entre os pequenos produtores, mesmo sabendo que o custo/benefício da inoculação, por hectare, é em torno de 10 a 20 reais, bem inferior aos custos da adubação nitrogenada que pode variar de 250 a 500 reais por hectare. Diante desta situação, torna-se importante estudar

estratégias para seleção de novas estirpes, no sentido de aperfeiçoar o processo de FBN em feijão-caupi.

2.3 Fatores limitantes a fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A diversidade e a atividade dos microrganismos fixadores de nitrogênio dependem das condições químicas, físicas e biológicas do solo. Além disso, sua sobrevivência e desenvolvimento estão diretamente relacionados aos fatores genéticos inerentes ao simbiote e sua interação com o meio externo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A habilidade e capacidade desses microrganismos, sobretudo os fixadores de nitrogênio, suportar condições adversas de clima, solo e bem como a capacidade de tolerância à acidez são de considerável importância agrícola e tem sido estudada por diversos autores (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994; HARA; OLIVEIRA, 2005.; MEDEIROS., et al 2007.; FREITAS et al 2007).

Os principais fatores relacionados ao clima que afetam a FBN são a temperatura e o regime de chuva. Temperatura elevadas e falta de água afetam alguns estágios importantes da infecção, formação e função dos nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No entanto, este efeito pode variar entre as espécies de leguminosas e também entre os rizóbios (HUNGRIA e VARGAS, 2000). Além disso, estiagens prolongadas também tem se mostrado limitante a população de rizóbios no solo com drástica redução da população que pode ser superior a 99% considerando o início da estiagem no mês de setembro a março no final do período (ZILLI et al., 2013).

O pH do solo pode interferir tanto na simbiose entre o rizóbio e as leguminosas, bem como na multiplicação, sobrevivência, nodulação e fixação de nitrogênio (HUNGRIA; VARGAS, 2000). No entanto, algumas bactérias fixadoras de nitrogênio tem apresentado crescimento ideal em pH entre 6,0 e 7,0 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e outras tem demonstrado resistência em pH menor que 5,0 (GRAHAM et al., 1994.; ALI et al., 2009). As estirpes caracterizadas como sendo de crescimento rápido geralmente são as que apresentam menor tolerância à acidez do que as de crescimento lento (GRAHAM et al., 1994.; MOREIRA; SIQUEIRA., 2006). Vale ressaltar que a tolerância à acidez tem sido diferenciada entre as espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio e é uma das características utilizada para caracterização de rizóbios.

Mesmo sendo um dos elementos mais requeridos pelas plantas, o nitrogênio mineral também é considerado fator limitante da FBN, pois em excesso no solo reduz a nodulação, uma vez que havendo disponibilidade de N mineral no solo, a planta não necessita estabelecer simbiose para suprir suas necessidades. Além disso, a presença de N mineral reduz à adesão das células dos rizóbios as raízes das leguminosas e indiretamente reduz à formação de nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os fatores bióticos também são considerados limitantes a nodulação das plantas leguminosas, dentre eles pode-se considerar a competição de estirpes inoculadas (exóticas) com as nativas, pelos sítios de infecção na raiz. Tal competição pode ocasionar diminuição na eficiência da fixação de N para a planta, pois com frequência se observa que a grande maioria das bactérias adaptadas no solo, apesar de competitivas são pouco eficientes na FBN (COSTA et al., 2011).

Devido a essas limitações a seleção de bactérias eficientes na fixação de nitrogênio, competitivas e adaptadas a condições predominantes dos solos brasileiros torna-se importante.

2. 4 Seleção de estirpes de rizóbios

Nem sempre a população de rizóbio nativa do solo é capaz de estabelecer uma simbiose mutualista com o hospedeiro cultivado. E esse entendimento da associação rizobio-leguminosa nas condições apresentadas dos solos da Amazônia (ácidas e de baixa fertilidade) pode contribuir de forma positiva no balanço de nitrogênio tanto no solo como nas plantas (CHAGAS JUNIOR et al., 2010).

O processo de seleção e caracterização visando à obtenção de estirpes eficientes na FBN e competitiva frente à população nativa são etapas fundamentais para o sucesso da FBN, o qual tem sido muito estudado (HARA; OLIVEIRA, 2005; SILVA et al., 2007), principalmente com leguminosas de importância econômica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

No Brasil a seleção de bactérias eficientes na fixação de nitrogênio é realizada de acordo com as exigências do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essas bactérias são submetidas a diferentes estágios de seleção em que primeiramente são isoladas, seguido pela sua caracterização morfofisiológica e identificação genotípica. Posteriormente são submetidas a ensaios em ambiente protegido (vasos de Leonard com substrato esterilizado) livre de nitrogênio e em (vasos com solo esterilizado), e por último em experimento de campo.

Após os testes em ambientes protegidos, aquelas bactérias que não apresentarem bom desempenho são eliminadas, pois, considera que se não estabelecem simbiose eficiente em condições ótimas de cultivos (nutricionais e ambientais), não será diferente nas condições mais estressantes do solo. A partir daí de acordo o MAPA, são avaliados alguns parâmetros mínimos, como número e a massa de nódulos secos (g/planta⁻¹ ou vaso); massa seca da parte aérea (g/planta⁻¹); nitrogênio total na massa seca (mg de N/planta) e a eficiência nodular (mg de N da massa seca de planta/mg de nódulos secos).

Atualmente as estirpes que fazem parte da lista dos microrganismos autorizados pelo MAPA, recomendadas como inoculantes para cultura do feijão-caupi são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, sendo duas resultantes de experimento da Embrapa (BR3267, BR 3262) e duas resultantes de experimento realizado na UFLA (UFLA03-84, INPA3-11B) (BRASIL, 2011). São estirpes isoladas de solos brasileiros, o que constitui em vantagem para o uso em diferentes regiões do Brasil.

O fato do feijão-caupi ser nodulado predominantemente por bactérias pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* sp. (cujo gene de nodulação e FBN encontram-se no cromossomo, considerado mais estável), representa uma vantagem, tendo em vista que estirpes pertencentes a este gênero mantêm por mais tempo sua eficiência. Diferentemente de outras espécies de leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, que se associa com bactérias de crescimento rápido (gênero *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Burkholderia*), cujos genes de nodulação e FBN muitas vezes encontram-se em plasmídeos, considerados menos estáveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Diante disso, justifica-se novas seleções de estirpes de rizóbio capazes de fixar maiores quantidades de N₂ quando em simbiose com feijão-caupi, de forma a garantir o uso de germoplasma microbiano de qualidade para a produção de inoculantes no Brasil.

2.5 Caracterização de rizóbios

Para a estruturação de uma coleção de rizóbios é indispensável que estes sejam caracterizados, a partir de atributos fenotípicos (morfológicos, fisiológicos e bioquímicos) e, ainda geneticamente (HUNGRIA & STACEY, 1997). Neste sentido as características culturais são utilizadas para uma triagem inicial, permitindo o agrupamento das estirpes a partir de seus perfis fenótipos, e otimizando os procedimentos ao longo do desenvolvimento da pesquisa (GUIMARÃES et al., 2012). Alguns gêneros constantemente encontrados em nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), em especial *Rhizobium* (RUMJANEK et al.,

2005); e *Bradyrhizobium* (ZILLI et al., 2006), apresentam características gerais bastante conhecidas (pH do meio de cultura, tempo de crescimento, coloração da colônia, entre outros atributos) e pouco alteráveis (LEITE et al., 2009; JESUS et al., 2005). Apesar disso, limitações na avaliação das características podem ocorrer devido às variações da composição e preparo de meio de cultura, ou mesmo no tempo em que foi realizada a caracterização. Mas é uma primeira avaliação útil para a caracterização de rizóbios isolados, possível de ser realizada em qualquer laboratório.

Atualmente a identificação polifásica tem dado suporte e minimizado tais avaliações subjetivas, pois é suportada por informações extraídas do genoma bacteriano que são mais estáveis em relação às variações do ambiente, tornando as análises mais segura (VANDEMME et al., 1996).

Os genes relacionados ao metabolismo primário, ou seja, aqueles envolvidos na manutenção das funções vitais das células bacterianas são bastante indicados para estudos de taxonomia de procariotos, dentre os mais utilizados destaca-se o gene ribossomal 16S *rRNA*. Trata-se de um gene que apresenta sítios conservados e outros hipervariáveis, sendo estes últimos aplicados na diferenciação de estirpes ao nível de gênero e algumas vezes em espécies (WEISBURG et al., 1991; CHUEIRE et al., 2003).

A utilização deste marcador é justificada pelo fato de existir um amplo banco de sequências que permite a comparação com outros trabalhos relacionados. No entanto, o sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA* permite apenas um indicativo de gênero, não oferece resolução para se chegar a espécie, principalmente para *Bradyrhizobium* considerado altamente conservado em relação ao seu gene 16S. Sendo assim é recomendável a realização de mais testes para identificação de espécies pertencentes a este gênero (COOPMAN; GILLIS; WILLEMS, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar e avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi isoladas de ambientes de mata e cerrado do estado de Roraima.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente estirpes de rizóbios capazes de nodular o feijão caupi;
- Avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios em casa de vegetação e em condições de campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das estirpes

Neste estudo, foram utilizadas 41 estirpes oriundas de ambientes de mata e cerrado do Estado de Roraima. A origem, bem como a análise química do solo utilizado para o cultivo do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] como planta isca esta apresentada na Tabela 1. Todas as estirpes foram obtidas anteriormente a este estudo e encontra-se depositadas na coleção de culturas da Embrapa Roraima (coleção de cultura de microrganismos multifuncionais da Embrapa Roraima). As amostras de solo foram coletadas nas diferentes áreas e cultivadas em casa de vegetação com feijão-caupi. Posteriormente, os nódulos obtidos foram isolados em meio 79 (FRED; WASKMAN, 1928), originando as 41 estirpes (MIRANDA, 2008).

Tabela 1- Local de coletas do solo para cultivo de feijão-caupi como planta-isca e atributos químicos das respectivas amostras de solo.

Área	Fito-fisionomia	Coordenadas	Município	pH	Ca	Mg	K	Al	P	MO	Número de Estirpes
				H ₂ O	cmol _c /dm ³			mg/dm ³		g. Kg ⁻¹	
1	Mata	N 1° 2' 03,6" W 59° 53' 06,5"	Caracarái (Prop. particular)	4,50	1,10	0,42	0,20	0,73	4,14	31,60	3
2		N 2° 36' 07,1" W 60° 57' 01,0"	Mucajaí (Prop. particular)	4,50	0,47	0,32	0,20	0,43	2,90	27,20	4
3		N 1° 28' 35,1" W 60° 44' 41,2"	Caracarái (Prop. particular)	5,30	0,78	0,37	0,05	0,43	2,20	30,10	2
4		N 02° 39' 48" W 60° 50' 15"	Cantá (Campo exper. confiança)	4,20	0,38	0,18	0,06	1,13	1,90	33,90	3
5		N 02° 24' 00" W 60° 58' 37, 46"	Mucajaí (Campo exper. Serra da Prata)	4,20	0,16	0,10	0,03	1,08	4,10	28,70	8

6	Cerrado	N 02° 56' 20" W 61° 00' 5"	Alto alegre (Prop. particular)	5,00	0,57	0,33	0,03	0,23	1,80	14,70	7
7		N 02° 57' 46" W 60° 42' 20"	Boa Vista (Campo Exper. Monte Cristo)	5,40	1,94	0,67	0,03	0,03	1,40	19,30	4
8		N 3° 52, 57' 35" W 59° 36, 58' 58"	Normandia (Prop. particular)	5,00	0,19	0,11	0,02	0,83	3,96	22,50	8
9		N 02° 15' 00" W 60° 39' 54"	Boa Vista (Campo Exper. Água Boa)	4,90	0,19	0,13	0,02	0,68	2,02	16,80	2

Fonte: (MIRANDA, 2008).

4.2 Caracterização morfológica cultural

As estirpes foram caracterizadas morfológicamente em meio de cultura YMA com indicador azul de bromotimol 5 mL L⁻¹ à 0,5% (FRED; WAKSMAN, 1928) e incubadas por sete dias a 28°C. A caracterização foi iniciada a partir do aparecimento das primeiras colônias. Para a caracterização morfológica cultural foram utilizadas 41 estirpes isoladas de ambientes de mata e cerrado em Roraima, e duas estirpes referências recomendadas para o feijão-caupi, sendo a BR 3262 e BR 3267 (BRASIL, 2011).

As características avaliadas foram: tempo de crescimento em dias: (1–3 rápido; 4-5 intermediário; 6-10 lento); diâmetro da colônia (< 2 mm pequena, 2–4 mm média, > 5 mm grande); forma da colônia (circular; irregular; puntiforme); elevação da colônia (plana; elevada; côncava; convexa; protuberante); borda da colônia [lisa (inteira), ondulada, lombada, dentada e filamentosa]; transparência do muco (homogêneo ou heterogêneo); superfície da colônia (lisa ou rugosa); produção de muco (escassa, pouco, moderada e abundante); aparência e coloração da colônia; modificação do pH do meio (amarelo: ácido; verde: neutro; azul: alcalino); aparência do muco (transparente; translúcido; opaco).

As características foram transformadas em dados binários e suas semelhanças foram estimadas pelo coeficiente de Jacard (Sj) em que $S_j = a/a + b + c$. Onde, a é a presença das características em ambas as bactérias, b presença em uma bactéria e ausência em outra, e c é a ausência em uma bactéria e presença em outra. As estirpes isoladas e as estirpes referência foram agrupadas pelo método UPGMA (average linkage clustering) e representadas graficamente por um dendrograma (NTSYS – pc, versão 2.1t).

4.3 Caracterização Genotípica

4.3.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA das 41 estirpes, partindo-se do cultivo em meio YM (YMA sem Ágar) (FRED; WASKMAN, 1928) com incubação a 28°C, em shaker, a 150 rpm por 72 h. Após esse período, uma alíquota de 1 mL da suspensão das células foi transferida para microtubos de 1,5 mL, em seguida centrifugados a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e com o precipitado foi realizado a extração do DNA, utilizando-se o kit de extração de DNA genômico RBC[®] (catálogo: YGB 300).

A qualidade da extração do DNA foi verificada através de análise da intensidade e aparência das bandas obtidas por eletroforese ajustada para 30 min a 100 V em gel de agarose 1,0 %. Em seguida as amostras de DNA das estirpes foram armazenadas em freezer a -20°C.

4.3.2 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA*

A amplificação do gene 16S *rRNA*, foi realizada através de uma reação de 50 µL composta de 37,5 µL de água mili-Q estéril; 1 µL de dNTPs (2,5 mmol.L⁻¹ de cada base); 5 µL de tampão 10x (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 2 µL de MgCl₂ (50 mmol.L⁻¹); 1 µL dos oligonucleotídeos Y1 - 5' TGG CTCAGAACGAACGCTGGCGGC 3' e B3 5' TACCTTGTTACGACTTCACCCCA GCT 3' que amplificam praticamente toda a região do DNA (1.500 pares de bases, pb) à 12,5 pmol.µL⁻¹; 0,4 µL Taq (5 U.µL⁻¹, InvitrogenTM); e 2 µL de DNA bacteriano extraído.

As reações foram submetidas à amplificação em termociclador Mastercycler gradient[®] (EppendorfTM) ajustado para 1 ciclo de desnaturação de 95°C por 2 min; seguido por 35 ciclos de desnaturação (2 min. a 93°C), anelamento (1 min. a 62°C) e extensão (2 min. a 72°C); e uma etapa terminal de extensão (72° por 5 min), manutenção a 4°C. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit de purificação de PCR QI Aquick[®] (Cat. No. 28106) (QIAGENTM) kit Invisorb fragment clean up (250)[®] (InvitexTM) seguindo protocolo estipulado pelo fabricante. Após cada procedimento de amplificação e purificação as amostras foram submetidas à eletroforese ajustada para 1h a 100 V em gel de agarose a 1,0 % e registrada em sistema de fotodocumentação EC3 imaging system[®] (UVPTM), para verificação dos produtos de PCR. O sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA* foi realizado a partir do produto de PCR utilizando o iniciador Y1, sendo a corrida realizada em sequenciador 3730xl (Applied BiosystemsTM). As sequências foram submetidas à ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) para verificar a identidade das sequências dos rizóbios de feijão-caupi com as depositadas no GeneBank. As sequências das estirpes isoladas mais as sequências das estirpes tipo similares foram alinhadas utilizando o ClustalW (HIGGINS et al., 1994). E a árvore filogenética inferida pelo método de Neighbor-joining, utilizando o modelo de Kimura 2 (KIMURA, 1980) com 1000 repetições (bootstrap), com uso do programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011).

4.4 Eficiência das estirpes em casa de vegetação e campo

4. 4. 1 Eficiência simbiótica em casa de vegetação

Para avaliação da eficiência simbiótica foi conduzido um experimento em casa de vegetação utilizando vasos de Leonard (VINCENT, 1970), em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

A parte superior dos vasos de Leonard continha uma mistura de 2:1 de areia e de vermiculita, enquanto a inferior, 300 mL de solução nutritiva de Arnon e Hoagland. (1950) esterilizada a $\frac{1}{4}$ de força iônica (Tabela 2 Anexo A). Após o preparo, os vasos foram autoclavados duas vezes por uma hora, à pressão de $1,5 \text{ kg.cm}^{-2}$, a 127°C . Posteriormente foram dispostos em bancadas na casa de vegetação em condições de luminosidade natural e temperatura controlada em torno de $25\text{-}30^\circ\text{C}$.

Sementes de feijão-caupi cv. Guariba foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% e hipoclorito de sódio 3-5% por 2 minutos, seguindo-se 10 lavagens com água destilada esterilizada. Decorridos cinco dias da germinação foi realizado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Os inoculantes foram preparados cultivando-se as estirpes em meio 79 (FRED; WASKMAN, 1928) através de incubação a 28°C sob agitação de 150 rpm por 5 dias. Após este período foi aplicado 1mL do inoculante na base de cada plântula.

Das 41 estirpes do estudo foram incluídos apenas 36 estirpes e quatro controles: dois controles positivos com a inoculação da BR 3262 (ZILLI et al., 2009) e BR 3267 (MARTINS et al., 2003); um controle sem inoculação e sem adição de N mineral, e outro sem inoculação com adição de N mineral (210 mg/L^{-1} de N).

As plantas foram colhidas aos 30 dias após a germinação, para determinação do número e massa seca de nódulos, além da massa seca da parte aérea. Os nódulos e parte aérea foram secos em estufa (65°C) até o peso seco constante. Os dados foram analisados usando programa estatístico Sisvar versão 4.3 (FERREIRA, 2011), sendo realizados os testes de distribuição normal dos erros e a análise de variância. Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. E os dados de número de nódulos foram transformados para raiz quadrada de $(X + 0.5)$ e massa seca de nódulos em log de $(X + 0.5)$.

4. 4. 2 Experimento de campo

No mês de julho de 2013 foram conduzidos dois ensaios no campo experimental da Água Boa (área de cerrado), um em área de primeiro cultivo e outro em área já cultivada anteriormente com culturas anuais. O feijão-caupi (cultivar BRS Guariba) foi semeado coincidindo com a época de plantio na região, seguindo um delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições (Figura 1. Apêndice A), com uma cultivar de feijão-caupi e onze fontes de nitrogênio (duas estirpes de *Bradyrhizobium* BR 3262 e UFL03-84), recomendada para a cultura do feijão-caupi e oito estirpes nativas do solo de Roraima (ERR 24, ERR 25, ERR 26, ERR 39, ERR 40, ERR 42, ERR 45 e ERR 510), além, de um tratamento nitrogenado com 50 kg.ha⁻¹ N na forma de uréia parcelado 50% no plantio e 50% em cobertura 25 dias da emergência) e um controle sem inoculação e sem nitrogênio.

As oito estirpes foram selecionadas para ensaios em campo baseando-se no resultado de eficiência simbiótica do experimento de casa de vegetação, e ainda devidos às limitações do tamanho do experimento em condições de campo.

As áreas onde os experimentos foram instalados teve seu solo analisado antes da implantação dos ensaios de acordo com o protocolo seguido no Laboratório Agrotécnico Piracicaba Ltda. As amostras de solos foram retiradas na profundidade de 0 a 20 cm, exibindo as seguintes características (Tabela 3). Resultados antes das correções.

Tabela 3. Resultado da análise química e física do solo das áreas de (primeiro cultivo e área já cultivada) antes da implantação dos experimentos no campo experimental Água Boa.

Área de primeiro cultivo								Textura		
pH	P	K	Ca	Mg	Al	V	M.O	Areia	Silte	Argila
CaCl ₂	mg/dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³			%	g dm ⁻³	g. Kg ⁻¹		
4,1	3	0,1	2	1	8	11	11	750	54	206
Área cultivada								Textura		
pH	P	K	Ca	Mg	Al	V	M.O	Areia	Silte	Argila
CaCl ₂	mg/dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³			%	g dm ⁻³	g. Kg ⁻¹		
5,1	11	0,5	8	4	0	44	14	740	37	223

Fonte: Laboratório Agrotécnico Piracicaba Ltda. P- Fósforo; K - Potássio; Ca - Cálcio; Mg - Magnésio; Al - Alumínio; V-Saturação por bases; M.O - Matéria orgânica.

As adubações de plantio de ambos os experimentos consistiu de 90 kg.ha⁻¹ P₂O₅ na forma de superfosfato simples e 15 kg.ha⁻¹ de KCl na forma de cloreto de potássio, sendo distribuído com semeadoura mecânica na linha de plantio. As adubações em cobertura foram;

adubação nitrogenada na emergência (25 g por linha de 5m) e com potássio aos 35 dias da emergência (cerca de 0,25 kg por parcela).

O preparo e avaliação da qualidade dos inoculantes foram realizados no laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima, utilizando as oito estirpes obtidas de ambientes de mata e cerrado em Roraima, e mais duas estirpes recomendadas para a cultura do feijão-caupi, BR 3262 e a UFLA 03-84 (BRASIL, 2011). O preparo e a avaliação da qualidade do inoculante foram realizados de acordo com métodos de Araújo e Hungria. (1994).

O inoculante turfoso apresentou concentração final de 1×10^8 unidades formadora de colônia (UFC) por grama de inoculante. Para atingir 600 mil UFC g de semente, inoculou-se 3,6g do inoculante em 600g de sementes. A semeadura foi realizada logo após a inoculação em que consistiu na distribuição manual de 10 sementes por metro na linha, em parcela de 5 m de comprimento por 5 de largura, com uma área de 25 m^2 e espaçamento entre linha de 0,45 m.

Aos 35 dias após a emergência (DAE) que coincidiu com o início da floração coletou-se 10 plantas da segunda linha de plantio de cada parcela, para avaliação da matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN), e N- total da parte aérea. Para determinação da produção de matéria seca, as plantas foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar à 65° C até atingir peso constante, e posteriormente pesado e contabilizado. A determinação de N foi realizada no Laboratório de Análises de Solo e Plantas-LSP, da Embrapa Roraima, pelo método semi-microkjedhal (nitrogênio total), seguindo protocolo adotado no laboratório LSP (LIAO, 1981).

Na colheita foi avaliado a produtividade dos grãos (umidade 13%) coletando-se uma área útil de $8,1 \text{ m}^2$ nas 6 linhas de centrais, desconsiderando 1 m em cada bordadura

Os dados foram analisados estatisticamente usando o programa Sisvar versão 4.3 (FERREIRA, 2011), sendo realizados os testes de distribuição normal dos erros e a análises de variância. Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. E os dados de número de nódulos, massa seca da parte aérea e nitrogênio total foram transformados para raiz quadrada de $(y + 1.0)$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica cultural

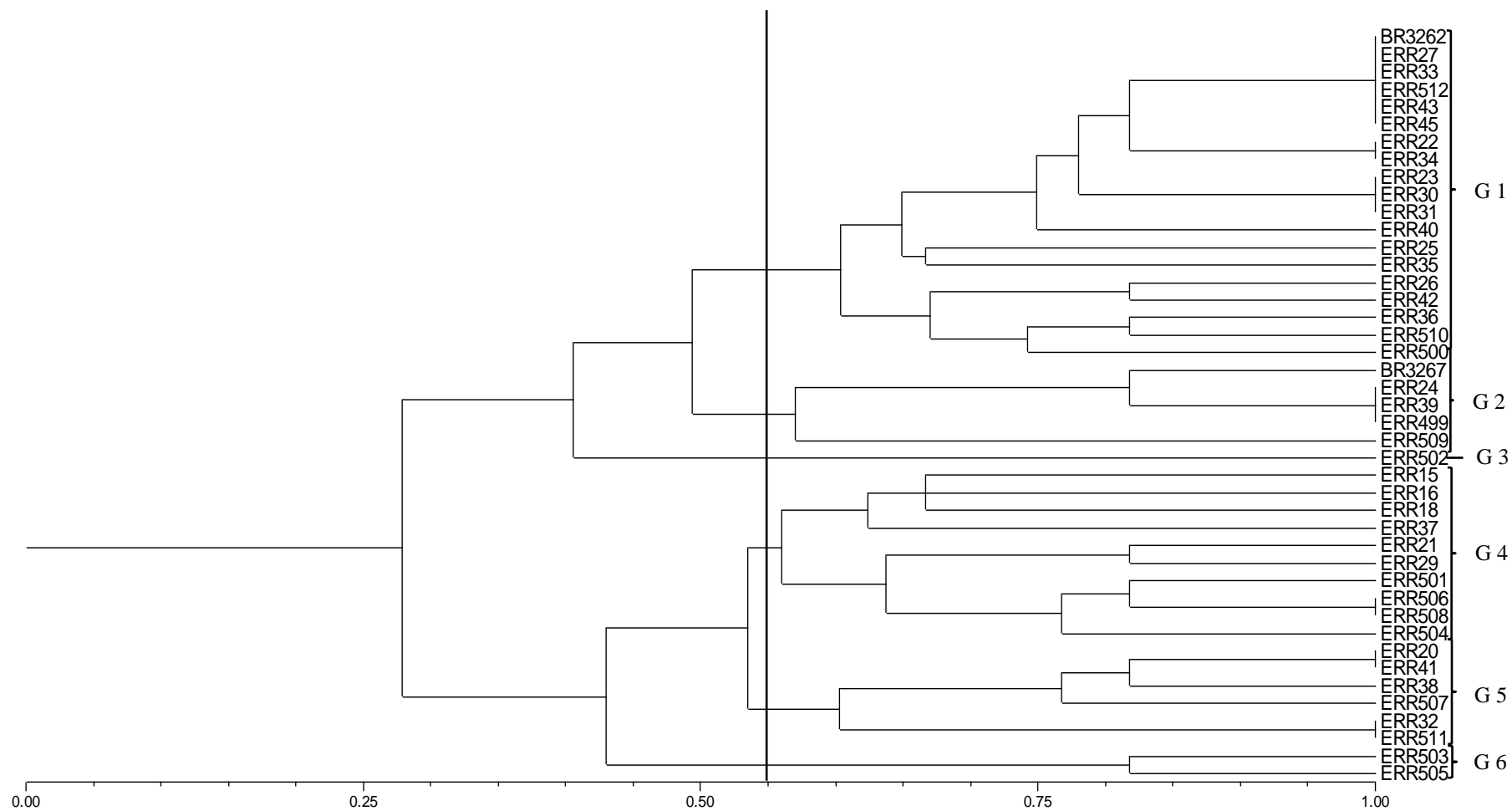
O resultado da caracterização morfológica das 41 estirpes analisadas no estudo está apresentado na Tabela 4 Apêndice B. Das 41 estirpes, 20 foram obtidas de amostras de solo coletados em áreas de mata (Município de Caracaraí, Mucajaí e Cantá) e 21 de solos coletados de áreas de cerrado (Município de Alto Alegre, Boa Vista e Normandia) (Tabela 1). A partir dos dados morfológicos, elaborou-se um dendrograma, no qual considerando uma similaridade de 55% obteve-se 6 grupos (Figura 2). O grupo 1, formado por 18 estirpes com características de crescimento lento e reação neutra do meio de cultura, apresentou similaridade de 55% com a BR 3262 (*Bradyrhizobium* sp.). O grupo 2 formado pelas estirpes ERR 499, ERR 39, ERR 24 e ERR 509, com predominância de crescimento lento e reação neutra do meio, apresentando similaridade de 55% com a BR 3267 (*Bradyrhizobium* sp.) recomendada como inoculante para o feijão-caupi. E no grupo 4 formado pelas estirpes ERR 15, ERR 16, ERR 18, ERR 37, ERR 21, ERR 29, ERR 504, ERR 501, ERR 506 e ERR 508 as mesmas apresentaram similaridade de 55% entre si. Os demais grupos formados apresentaram similaridade entre 60 e 80% com características principais de acidificar o meio de cultura e tempo de crescimento rápido. Ainda dentre os grupos formados observou-se alta diversidade entre as estirpes, uma vez que apresentaram características semelhantes às usualmente apresentadas por estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Cerca de 58% das estirpes apresentaram tempo de crescimento lento em meio de cultura YMA (Figura 3A), que é uma característica comum para estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. De fato, a maior parte dos estudos desenvolvidos até o momento mostra que o grupo de rizóbios nodulantes de feijão-caupi apresenta crescimento lento, característica de *Bradyrhizobium*, que são amplamente encontrados nos solos do Brasil (ZILLI et al., 2004; 2006.; LIMA et al., 2005.; SOARES et al., 2006.; MEDEIROS et al., 2009 e SILVA et al., 2012).

Na figura 3B encontra-se distribuídos as estirpes coletadas em áreas de mata e cerrado quanto as características de pH do meio de cultura. Observou-se uma maior quantidade de estirpes para as características de pH ácido e neutro. Resultados também observados por Medeiros et al. (2009), em estudo de diversidade de rizóbio isolados de nódulos de feijão-caupi em solos do Estado do Rio Grande do Norte. Resultado que corrobora ao encontrado por Fernandes et al. (2003), ao caracterizar estirpes nativas dos tabuleiros costeiros de

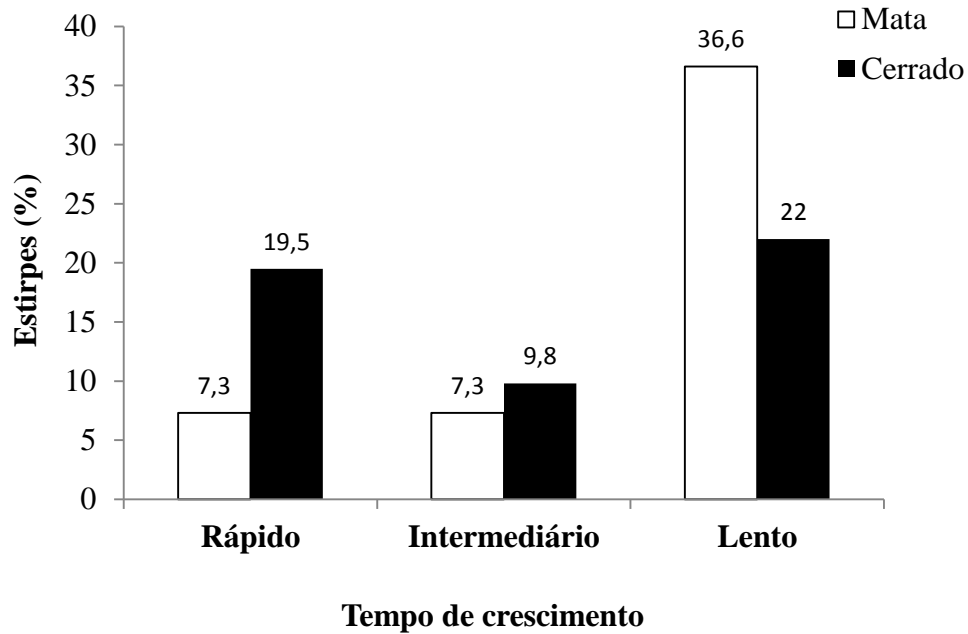
Sergipe, os mesmos constataram alta diversidade entre as estirpes, uma vez que observaram estirpes com similaridade tanto para *Bradyrhizobium* quanto para *Rhizobium*.

Figura 2 - Dendrograma de similaridade formado pelo (algoritmo UPGMA e coeficiente de jaccard) de estirpes que nodulam o feijão-caupi coletadas em área de mata e cerrado do Estado de Roraima.



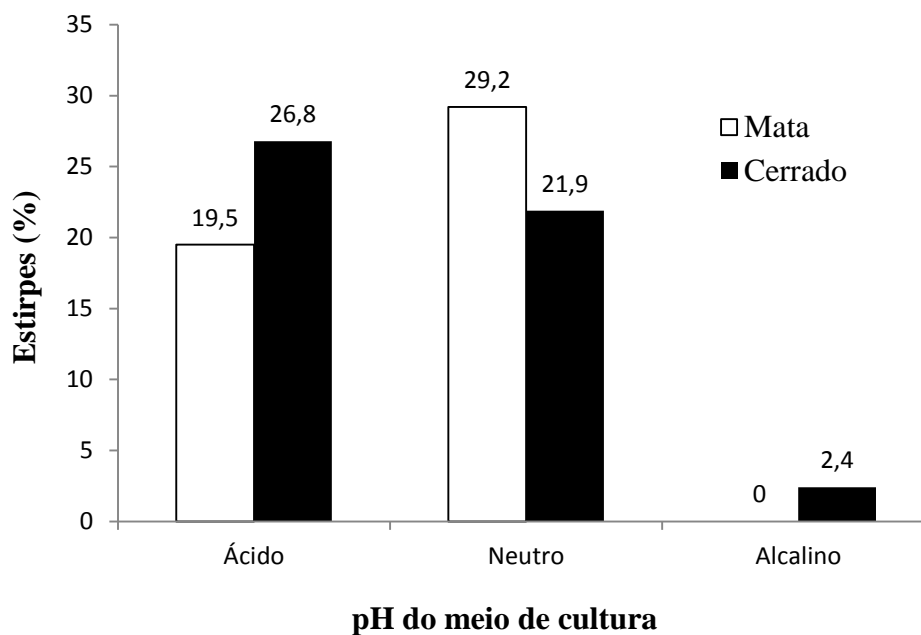
Fonte: Autor.

Figura 3A - Distribuição em porcentagem quanto ao tempo de crescimento em meio com extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) de estirpes obtidas de amostras de solo coletadas nas áreas de cerrado e mata do Estado de Roraima.



Fonte: Autor.

Figura 3B - Distribuição em porcentagem quanto ao pH em meio com extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) de estirpes obtidas de amostras de solo coletadas nas áreas de cerrado e mata do Estado de Roraima.



Fonte: Autor.

5.2 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA*

Após a amplificação e sequenciamento das estirpes, constatou-se que das 41 estirpes do estudo, 10 obtiveram apenas sequências do gene 16S *rRNA* curtas, com fragmentos menores que 250 pares de bases (bp), não sendo consideradas na análise. Para as demais estirpes (31) realizou-se inicialmente um alinhamento das sequências na base de dados do NCBI, através da ferramenta BLASTn (blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi). Verificou-se que as sequências das estirpes apresentaram similaridade acima de 99% com estirpes pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* ou *Agrobacterium* (Tabela 5 Apêndice G).

Posteriormente, realizou-se uma análise de agrupamento filogenético das sequências do gene 16S *rRNA* comparando as sequências das 31 estirpes com sequências de estirpes tipo obtidas a partir do Genbank (Figuras 4A e 4B). A análise revelou que 20 das estirpes agruparam-se com o gênero *Bradyrhizobium* e as demais 11 com os gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium* (Figura 4A e 4B). Estes dados corroboram ao relatado por Zilli et al. (2004; 2006), que boa parte das bactérias que nodulam o feijão-caupi tem sido do gênero *Bradyrhizobium*, o qual abrange um número grande de estirpes capazes de nodular várias espécies de leguminosas herbáceas comuns em região tropical.

Entre as estirpes que se agruparam com *Bradyrhizobium* (Figura 4A), observou-se que seis apresentaram alta similaridade com estirpes tipos designadas como membros do subgrupo I de *Bradyrhizobium* e as outras 14 com o subgrupo II. Fazem parte do subgrupo I de *Bradyrhizobium* espécies tradicionalmente observadas como nodulantes do gênero *Vigna*, que é o caso de *B. japonicum* e *B. yuanmingense* (ZHANG et al., 2007), além de várias outras espécies *B. canariense*, *B. daqingense*, *B. iriomotense*, *B. huanghuaihaiense*, *B. betae* e *B. arachidis* (Figura 4A). Por outro lado, no subgrupo II faz parte a tradicional espécie *B. elkanii*, amplamente conhecida como nodulante de feijão-caupi e as espécies de *B. jicamae*, *B. retamae*, *B. pachyrhizi* e *B. lablabi* (Figura 4A).

Estudos de levantamento de bactérias nodulantes de feijão-caupi no Brasil tem mostrado que de fato, com maior frequência ocorrem estirpes do subgrupo II de *Bradyrhizobium* como nodulantes, tendo estes estudos sido realizados tanto no Cerrado como em áreas de floresta amazônica (ZILLI et al., 2006.; GUIMARÃES et al., 2012). Isso mostra que provavelmente espécies de *Bradyrhizobium* afiliadas ao subgrupo II de *Bradyrhizobium* devam ser as principais bactérias nodulantes de feijão-caupi também em áreas do Estado de

Roraima. Vale ressaltar que as estirpes deste trabalho foram obtidas a partir de amostras de solo coletadas em áreas ainda não cultivadas com culturas anuais, comprovando efetivamente serem estirpes nativas dos solos de Roraima.

As estirpes que afiliaram-se ao subgrupo de *Bradyrhizobium* (Figura 4A), apresentaram características fenotípicas semelhantes (crescimento lento e pH neutro do meio com YMA), com exceção da estirpe ERR 510 que exibiu crescimento rápido e pH neutro do meio de cultura. Ainda observou-se que compõem este subgrupo de *Bradyrhizobium*, quatro das estirpes que fazem parte da lista dos microrganismos autorizados pelo MAPA, recomendadas como inoculantes para cultura do feijão-caupi, sendo três (BR 3262, UFLA03 84 e INPA03 11B) do subgrupo II e uma (BR 3267) do subgrupo I, as mesmas apresentaram semelhança acima de 80 % com as estirpes em estudo e demais espécies de *Bradyrhizobium* (Figura 4A).

Entre as estirpes que se afiliaram com o gênero *Rhizobium*, ERR 21, ERR 511, ERR 29 e ERR 23 se agruparam com *R. pusense* com similaridade de 98% (Figura 4B). Esta espécie foi isolada da rizosfera de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) (PANDAY; SHUMANN; DAS. 2011), porém não se tem conhecimento da associação desta espécie de *Rhizobium* com feijão-caupi. As demais estirpes com características de *Rhizobium* afiliaram-se com várias espécies de *Rhizobium* entre elas *R. miluonense* isolada de nódulos radiculares do gênero *Lespedeza*, pertencente a família das fabacea (GU et al., 2008). A ocorrência de nodulação do gênero *Vigna* com espécies de *Rhizobium* tem sido comum, inclusive recentemente houve a descrição de uma nova espécie, *Rhizobium vignae*, espécie que foi isolada a partir de várias leguminosas, incluído o gênero *Vigna* cultivadas em diferentes regiões da China (REN et al., 2011).

A análise de agrupamento das sequências parciais do gene 16S *rRNA*, permitiu observar que as estirpes (ERR 20 e ERR 511) de crescimento rápido e pH ácido do meio com YMA, teve similaridade com espécies de *R. pusense*, *R. miluonense*, *R. multihospitium*, *R. pisi* e *R. etli* (Figura 4B), corroborando com o resultado da caracterização fenotípica do presente trabalho. Por outro lado, as estirpes (ERR 16, ERR 15, ERR 18, ERR 23 e ERR 37) de crescimento lento e reação ácida e as (ERR 506, ERR 508, ERR 21 e ERR 29), de crescimento intermediário e pH ácido do meio com YMA, apresentaram alta similaridade com as espécies de *Rhizobium* (Figura 4B). Considerando que na literatura as características apresentadas por estirpes do gênero *Rhizobium* possuem crescimento rápido em meio de cultura, há um indicativo de que este grupo diverge em termos fenotípicos das características do gênero *Rhizobium*.

Desta forma, os resultados da caracterização fenotípica e da análise do sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA* indicou que as estirpes avaliadas nesse estudo distribuem-se em diferentes gêneros dos rizóbios e há uma predominância de *Bradyrhizobium*, sobretudo do subgrupo II (Figura 4A e B).

Figura 4A - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S *rRNA* das estirpes obtidas em solos de mata e cerrado em Roraima e estirpes tipo dos gênero *Bradyrhizobium*, obtidas no Genbank.

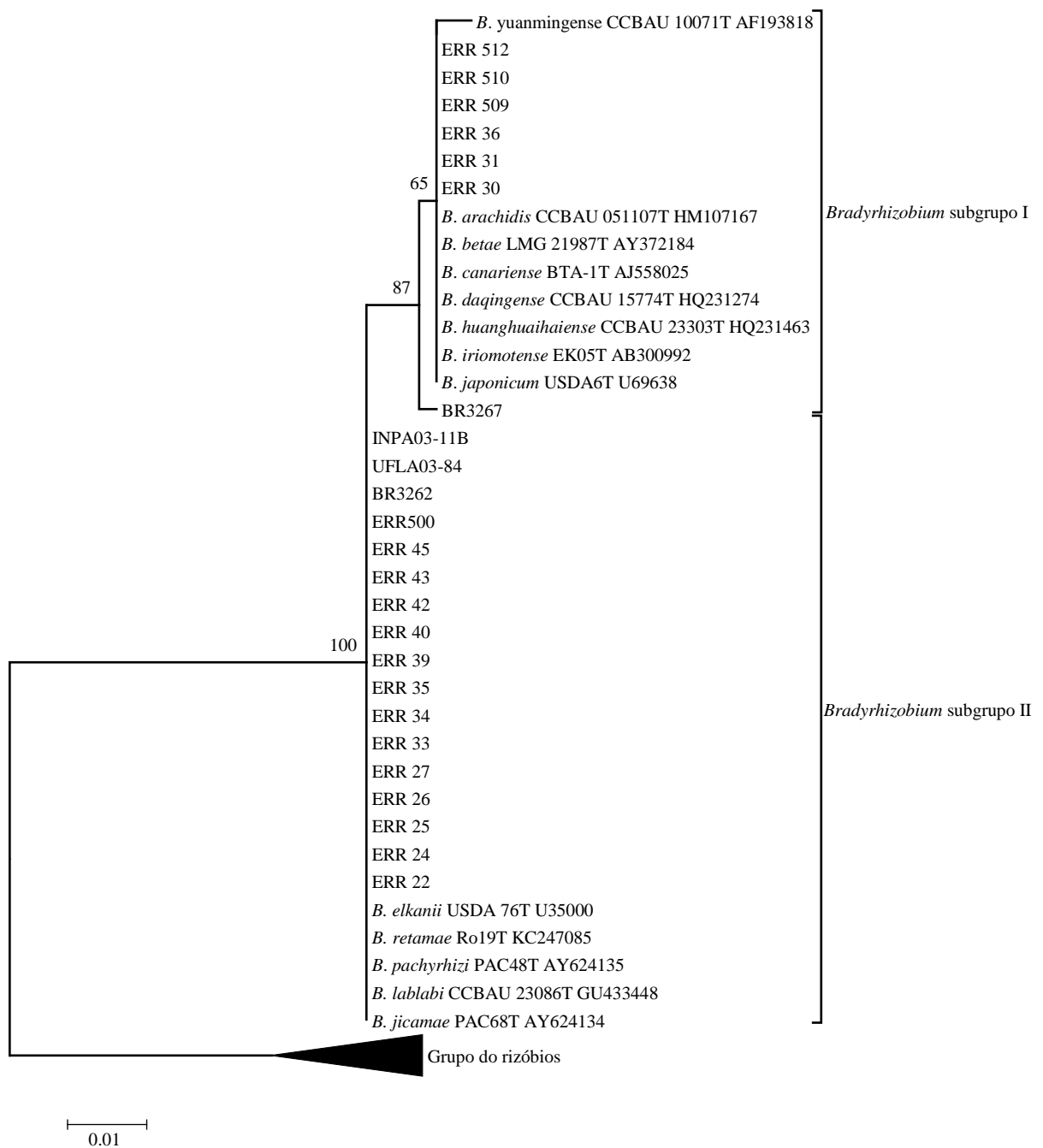
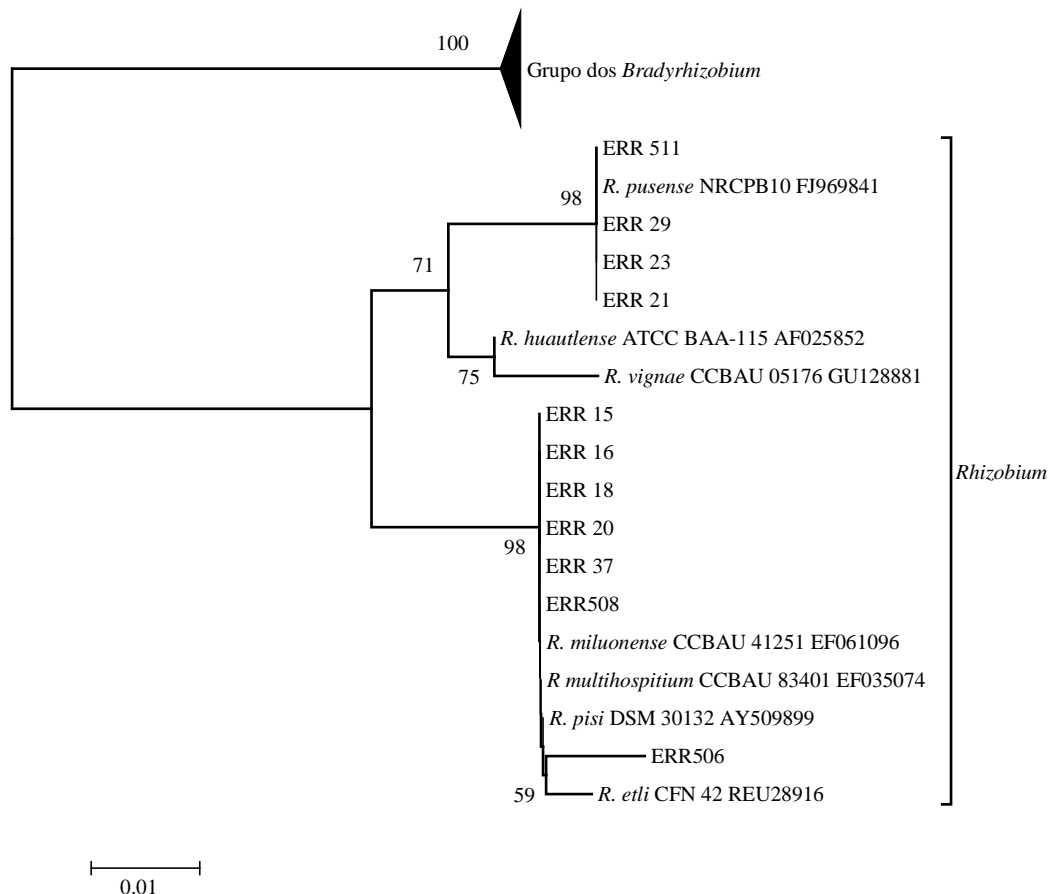


Figura 4 B - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S *rRNA* das estirpes obtidas em solos de mata e cerrado em Roraima e estirpes tipo dos gênero *Rhizobium*, obtidas no Genbank.



Fonte: Autor

5. 3 Eficiência simbiótica em casa de vegetação

Das 41 estirpes caracterizadas fenotipicamente, apenas 36 foram utilizadas para o teste em casa de vegetação. Todas as 36 estirpes nodularam o feijão-caupi, confirmando assim serem formadoras de nódulos. Ainda é importante mencionar que nos tratamentos que não receberam inoculação (controle sem inoculação e sem nitrogênio, e nitrogenado), não houve formação de nódulos nas plantas (Tabela 6), o que mostra que não houve contaminação no experimento.

Todas as 25 estirpes que nodularam abundantemente o feijão-caupi contribuíram significativamente para o crescimento das plantas (Tabela 6). No geral, as estirpes ERR 24, ERR 25, ERR 26, ERR 27, ERR 30, ERR 31, ERR 32, ERR 33, ERR 34, ERR 35, ERR 36,

ERR 39, ERR 40, ERR 41, ERR 42, ERR 43, ERR 45, ERR 498, ERR 499, ERR 500, ERR 501, ERR 509, ERR 510, ERR 511 e ERR 512 apresentaram número de nódulos superiores às outras estirpes e similares aos apresentados pelas estirpes recomendada para o feijão-caupi (Tabela 6).

As estirpes que apresentaram maior número de nódulos (NN) nas plantas de feijão-caupi, também contribuíram para maior massa de nódulos secos (MSN), com exceção de quatro estirpes (ERR 498, ERR 499, ERR 501 e ERR 511) que tiveram massa de nódulos muito baixa. Os valores de número de nódulos similares ao observados para massa seca de nódulos, indica um aumento na MSN em função do desenvolvimento das plantas, sendo que os maiores valores de MSN observados para 11 estirpes (ERR 24, ERR 25, ERR 26, ERR 36, ERR 40, ERR 41, ERR 42, ERR 43, ERR 45, ERR 500 e ERR 512), foram acima de 0,200 g por planta, iguais ou superiores aos valores encontrados para as plantas inoculadas com as estirpes-referência (Tabela 6). Resultados semelhantes foram reportados por Lacerda et al. (2004), Lima et al. (2005) e Soares et al. (2006) os quais observaram melhor eficiência simbiótica entre as bactérias isoladas nodulantes de feijão-caupi em relação as padrões.

De acordo com Ferreira et al. (2011), a elevada produção de MSN em plantas inoculadas, é uma característica relevante em bactérias que possam vir a ser usadas como inoculantes, uma vez que a manutenção da nodulação durante a fase reprodutiva pode resultar em aumento de produtividade. No entanto, segundo Araújo et al. (2007), o número e a massa dos nódulos são indicativos de nodulação, porém a massa dos nódulos é um atributo mais viável para avaliação da nodulação, em virtude da melhor correlação com o desempenho simbiótico. Nesse sentido, as estirpes ERR 24, ERR 25, ERR 26, ERR 27, ERR 30, ERR 31, ERR 32, ERR 33, ERR 34, ERR 35, ERR 36, ERR 39, ERR 40, ERR 41, ERR 42, ERR 43, ERR 45, ERR 500, ERR 509, ERR 510 e ERR 512, mostraram melhor desempenho simbiótico com o feijão-caupi, com boas médias para as variáveis analisadas (Tabela 6).

Ao avaliar a massa seca da parte aérea (MSPA) verificou-se que 20 estirpes deste estudo contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento do feijão-caupi, comparado ao controle não inoculado e semelhante às plantas inoculadas com estirpes recomendadas para a cultura (Tabela 6). Além disso, observou-se que as estirpes (ERR 24, ERR 25, ERR 26, ERR 30, ERR 40, ERR 41, ERR 42, ERR 43, ERR 45, ERR 500, ERR 509, ERR 510 e ERR 512), apresentaram MSPA acima de 2g, e a estirpe ERR 39, com MSPA acima de 3g por planta, o que pode ser considerado um bom resultado para o curto período de condução de experimento. A avaliação desta variável é um indicativo do estado nutricional

das plantas, sendo importante para proporcionar à cultura grande potencial de produção (SOUZA et., 2008.; XAVIER et al., 2006).

Tabela 6 - Avaliação de parâmetros de desenvolvimento vegetal obtidos de feijão-caupi inoculados com estirpes nativas isoladas de ambiente de mata e cerrado em Roraima.

Tratamento	NN ⁽¹⁾ (Nódulo.planta ⁻¹)	MSN ⁽²⁾ (mg.planta ⁻¹)	MSPA (g/planta)	Tratamento	NN ⁽¹⁾ (Nódulo.planta ⁻¹)	MSN ⁽²⁾ (mg.planta ⁻¹)	MSPA (g/planta)
BR 3262	22 a	210 a	2,2 a	ERR 37	7 b	43 b	0,8 b
BR 3267	31,66 a	226 a	2,8 a	ERR 39	22,5 a	183 a	3,3 a
Controle	0 b	0 b	1,5 b	ERR 40	22,8 a	270 a	2,7 a
Nitrogenada	0 b	0 b	1,7 a	ERR 41	24,8 a	216 a	2,3 a
ERR 15	4,3 b	10 b	0,8 b	ERR 42	25 a	216 a	2,5 a
ERR 18	6 b	33 b	0,8 b	ERR 43	27,3 a	220 a	2,1 a
ERR 20	6,5 b	2,3 b	0,9 b	ERR 45	30,7 a	236 a	2,5 a
ERR 21	5,3 b	6 b	1,2 b	ERR 498	16,2 a	83 b	1,2 b
ERR 22	11,8 b	5 b	0,9 b	ERR 499	16,8 a	63 b	0,9 b
ERR 24	26 a	270 a	2,7 a	ERR 500	25 a	213 a	2,3 a
ERR 25	25,2 a	286 a	2,6 a	ERR 501	15,5 a	130 b	1,9 a
ERR 26	27,3 a	293 a	2,6 a	ERR 502	6,5 b	50 b	1,2 b
ERR 27	23,5 a	200 a	1,9 a	ERR 503	4,5 b	36 b	1,1 b
ERR 30	14,3 a	130 a	2,1 a	ERR 504	10,3 b	53 b	1,5 b
ERR 31	14,5 a	180 a	1,8 a	ERR 507	11 b	90 b	1,2 b
ERR 32	25,5 a	136 a	1,1 b	ERR 508	11 b	90 b	1,4 b
ERR 33	15,7 a	163 a	1,8 a	ERR 509	17 a	156 a	2,1 a
ERR 34	26,2 a	196 a	1,8 a	ERR 510	26,5 a	200 a	2,4 a
ERR 35	21,1 a	190 a	1,9 a	ERR 511	22 a	86 b	1,1 b
ERR 36	28 a	233 a	1,7 b	ERR 512	27,6 a	230 a	2,3 a
CV (%)	31,8	45,2	22,8	CV (%)	31,8	45,2	22,8

Fonte: Autor.

Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) do feijão-caupi em experimento conduzido em casa de vegetação.

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dados transformados para $(X + 0,5)^{(1)}$ e $\log(X + 0,5)^{(2)}$.

5.4 Avaliações do experimento em campo

A análise química das áreas onde foram conduzidos os experimentos apresentaram baixo teor de matéria orgânica (Tabela 3). Na área de primeiro cultivo observou-se baixos teores de P, K, Ca + Mg, elevada acidez e baixa saturação por bases (Tabela 3). Por outro lado, na área já cultivada anteriormente, verificou-se melhores resultados para P, Ca e Mg comparativamente a área nova.

De modo geral esses resultados encontram-se de acordo com o que tem sido observado nos solos do cerrado do Estado de Roraima, apresentam-se com classe textural arenosa, deficientes ou com valores muito baixos de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, entre outros nutrientes (EMBRAPA RORAIMA, 2005). Estes resultados interferem negativamente para simbiose entre o rizóbio e o feijão-caupi, bem como para a nodulação e fixação de nitrogênio (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Além disso, é importante destacar que para o bom desempenho da FBN é interessante que o solo apresente boas condições química, física e biológica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

No experimento conduzido em área de primeiro cultivo, apenas a BR 3262 exibiu valor significativamente maior para número de nódulos (NN), sendo os demais tratamentos com resultados semelhantes ao controle e nitrogenado (Tabela 7). Da mesma forma, para massa seca de nódulos (MSN), a BR 3262 proporcionou média superior aos demais tratamentos. Apesar de não exibir diferença significativa observou-se maior MSN para três estirpes (ERR 39, ERR 40 e ERR 42), chegando ser superior aos tratamentos controle e nitrogenado em termos absolutos (Tabela 7).

Quanto à massa seca da parte aérea (MSPA), tanto em relação ao tratamento nitrogenado como para as estirpes recomendadas para o feijão-caupi, não houve diferença significativa (Tabela 7). Por outro lado, para o nitrogênio total (NT) da parte aérea, o tratamento inoculado com a estirpe ERR 510 apresentou valor significativamente superior aos demais tratamentos, inclusive o nitrogenado. Ainda quanto ao NT, as estirpes ERR 24, ERR 39 e ERR 40, apesar de não apresentarem significância, exibiram valores iguais aos tratamentos com as BR 3262, UFLA03-84 e tratamento nitrogenado, apresentando bom desempenho quanto NT nas duas áreas de estudo.

Em relação à produtividade de grãos, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 7). Por outro lado, os tratamentos com as estirpes ERR 24, ERR 42, ERR 510 e a BR 3262, apresentaram rendimento superior ao tratamento

nitrogenado (50 kg.ha⁻¹ de N no plantio) em termos absolutos, chegando à estirpe ERR 510 produzir 10% a mais de grãos comparativamente ao controle.

Estes resultados indicam que apesar de haver uma população de bactérias estabelecidas no campo com eficiência na FBN para o feijão-caupi, como já observado por Costa et al. (2011), inclusive com capacidade de proporcionar rendimento de grãos acima de 1200 kg.ha⁻¹. Algumas das novas estirpes utilizadas nesse trabalho (ERR 24, ERR 39, ERR 40 e ERR 510) mostraram-se competitivas e eficientes com tendência de aumentar a produtividade de grãos e de forma semelhante às estirpes já recomendadas e até o controle nitrogenado. É possível que em situações em que haja maior demanda por nitrogênio por parte da planta, maiores benefícios sejam observados para algumas das novas estirpes, isto porque o rendimento do feijão-caupi esteve a quem do seu potencial (ZILLI et al., 2009).

Tabelas 7 - Médias da massa seca da parte área, número e massa seca de nódulos secos, nitrogênio total e produtividade de feijão-caupi em experimento conduzido em área de primeiro cultivo no campo experimental Água Boa. Embrapa Roraima.

TRATAMENTO	*NN (nódulos. planta⁻¹)	MSN (mg.palnta⁻¹)	*MSPA (g.planta⁻¹)	*NT (mg.planta⁻¹)	Prod. kg.ha⁻¹
BR 3262	42,3 a	351,5 a	6,1	192,5 b	1313,4
UFLA03-84	15,9 b	214,7 c	5,7	213,4 b	1175,4
CONTROLE	21,4 b	186,5 c	6,0	111,2 c	1220,0
NITROGENADO	13,4 b	82,5 d	6,2	213,1 b	1273,3
ERR 24	22,7 b	210,2 c	6,2	204,8 b	1383,7
ERR 25	15,4 b	205,7 c	4,4	132,2 c	1003,1
ERR 26	17,6 b	188,5 c	4,7	163,6 c	1248,3
ERR 39	21,8 b	270,0 b	6,8	253,3 b	1233,8
ERR 40	23,9 b	287,0 b	6,9	209,5 b	1233,8
ERR 42	20,6 b	260,0 b	6,2	157,3 c	1348,5
ERR 45	26,2 b	212,2 c	5,6	149,0 c	1115,5
ERR 510	17,8 b	250,0 b	7,6	360,2 a	1369,3
CV%	19,8	22,4	10,2	15,3	15,8

Fonte: Autor

NN: número de nódulos; MSN: massa seca de nódulos; MSPA: massa seca da parte aérea; NT: nitrogênio total e Prod: produtividade.

Medias seguida das mesmas letras, nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. *Dados transformados para raiz quadrada de (y + 1.0).

No experimento conduzido em área já cultivada com culturas anuais, observou-se que para todos os tratamentos inoculados houve aumento do número de nódulos das plantas de feijão-caupi comparativamente ao controle (Tabela 8). Também observou-se que as oito estirpes em estudo proporcionaram aumento significativo para massa seca de nódulos das

plantas de feijão-caupi, sendo superiores as estirpes padrões e ao tratamento nitrogenado (Tabela 8).

Para a massa seca da parte área (MSPA), não houve diferença significativa entre os tratamentos, seja o nitrogenado ou inoculado em comparação ao controle (Tabela 8). Apesar de não ter diferença significativa para esta variável, a estirpe ERR 40 proporcionou melhor acúmulo de MSPA em relação aos demais tratamentos. Além disso, quanto ao nitrogênio total (NT) da parte área a mesma estirpe ERR 40 (Tabela 8), apresentou o melhor resultado sendo significativamente superior às estirpes recomendadas, ao tratamento nitrogenado e também maior que algumas das demais estirpes.

Observa-se, com maior frequência que estirpes com alta similaridade a *B. japonicum* (sub-grupo I) contribuem para maior cúmulo de N na cultura da soja, comparadas às estirpes de *B. elkanii* (sub grupo II) (SANTOS et al., 1996). No entanto, observou-se que no presente trabalho que as estirpes que melhor contribuíram para o acúmulo de N, foram as que apresentaram maior similaridade com estirpes de *B. elkanii*, sendo no total de cinco estirpes (ERR 24, ERR 25, ERR 26, ERR 39 e ERR 40). Isso corrobora com informações anteriores de que além de *Bradyrhizobium* pertencentes ao sub-grupo II de *B. elkanii* estarem presentes frequentemente em nódulos de feijão-caupi, também apresentam alta eficiência (ZILLI et al., 2006).

Para a produtividade, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 8). Porém, entre os tratamentos inoculados, a estirpe ERR 40 apresentou rendimento superior ao tratamento nitrogenado ($50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N no plantio). Ainda quanto à produtividade observou-se que os tratamentos com as estirpes BR 3262 e UFLA03 84 apresentaram rendimento inferior há algumas estirpes testadas neste trabalho, o que mostra potencial para a seleção de novos inoculantes (Tabela 8).

É interessante notar que apesar das plantas do tratamento controle apresentar o menor acúmulo de N na parte aérea, comparativamente aos demais tratamentos, quanto à produtividade houve resultado similar (Tabela 7 e 8). Aparentemente isso indica que existiu algum fator, que não o N, que limitou o desenvolvimento das plantas, isto porque apesar de haver oferta de N, não houve aumento do rendimento de grãos (MELO e ZILLI., 2009). Novamente, como observado para o primeiro experimento, se as plantas demandassem maior quantidade de nitrogênio para um eventual maior rendimento de grãos, os tratamentos inoculados com algumas das estirpes poderiam apresentar melhor desempenho.

Nota-se que na área de primeiro cultivo apenas a BR 3262 (Tabela 7), apresentou número e massa seca de nódulos significativos, indicando a alta capacidade dessa estirpe em

competir com a população de rizóbio estabelecida no solo e ainda mostrando sua grande eficiência em proporcionar massa de nódulos superior aos outros tratamentos em condições de campo, como já observado por (ZILLI et al., 2006.; MELO e ZILLI., 2009).

Vale destacar que a área nova não tem histórico de cultivos anteriores, e apesar da população de rizóbio presente no solo não ter sido estimada, é possível deduzir que havia uma população de rizóbio estabelecida nesta área, considerando a ampla nodulação no tratamento controle. Provavelmente a presença de leguminosas espontâneas é fator que mantém esta população estabelecida em condições naturais. Por outro lado a menor nodulação do tratamento nitrogenado nas duas áreas (Tabela 7 e 8) observado neste trabalho é fato comum, pois o N mineral aplicado no plantio inibe a nodulação espontânea e a eficiência de fixação biológica do N₂ (SOARES et al., 2006.; SOUZA; SORATTO; PAGINI, 2011).

Tabela 8 - Médias da massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos secos, nitrogênio total e produtividade de feijão-caupi em experimento conduzido em área cultivada no campo experimental Água Boa. Embrapa Roraima.

TRATAMENTO	NN (nódulos. Planta ⁻¹)	MSN* (mg.planta ⁻¹)	MSPA* (g.planta ⁻¹)	NT* (mg.planta ⁻¹)	Prod.Kg. ha ⁻¹
BR 3262	20,5 a	85,0 b	7,0	252,5 b	1220,1
UFLA03-84	13,8 a	87,7 b	6,9	275,3 b	1352,1
CONTROLE	4,7 b	57,2 b	7,1	60,4 d	1239,7
NITROGENADO	4,6 b	66,0 b	7,9	362,5 b	1292,0
ERR 24	16,7 a	228,0 a	5,6	180,9 c	1207,5
ERR 25	16,8 a	146,5 a	5,8	284,1 b	1066,0
ERR 26	24,2 a	164,7 a	7,0	259,3 b	1248,1
ERR 39	22,5 a	188,7 a	7,7	185,7 c	1256,9
ERR 40	21,9 a	243,5 a	10,5	521,8 a	1324,6
ERR 42	23,0 a	163,0 a	7,0	240,1 b	1191,4
ERR 45	19,8 a	127,5 a	8,5	178,8 c	1115,3
ERR 510	22,2 a	256,2 a	7,5	228,9 b	1185,3
CV %	38,7	23,1	15,7	18,7	22,6

Fonte: Autor

NN: número de nódulos; MSN: massa seca de nódulos; MSPA: massa seca da parte aérea; NT: nitrogênio total e Prod: Produtividade.

Medias seguida das mesmas letras, nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.*Dados transformados para raiz quadrada de (y + 1,0).

Também vale destacar, sobre os tratamentos controle das duas áreas (Tabelas 7 e 8), os quais apresentaram média de produtividade semelhante entre si (1220,03 kg.ha⁻¹ e 1239,77 kg.ha⁻¹) e superior comparativamente a média de produtividade de feijão-caupi para Roraima

que é 670 kg.ha^{-1} (CONAB, 2012), Isto mostra que, mesmo em solo com baixo teor de matéria orgânica (Tabela 1), foi possível obter produtividade média elevada dos tratamentos o que provavelmente é decorrente da contribuição da população de rizóbio estabelecida no solo para a produtividade do feijão-caupi, Resultados semelhantes foram relatos por Zilli et al, (2009), ao avaliar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e rendimento de grãos do feijão-caupi em Roraima,

Embora as estirpes em estudo não tenham sobressaído em comparação à nitrogenada e ao controle quanto à produtividade do feijão-caupi nos experimentos de campo, observou-se que as estirpes ERR 24, ERR 40 e ERR 510, apresentaram notável desempenho por apresentar boas médias de NN, MSN, MSPA, (Tabela 7 e 8) e produtividade, demonstrando potencial produtivo para Roraima, considerando os resultados das demais estirpes em estudo neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

- As estirpes de rizóbio obtidas de feijão-caupi apresentam elevada diversidade fenotípica e genotípica (16S *rRNA*);
- Houve predominância de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* em comparação ao gênero *Rhizobium*;
- Três estirpes (ERR 24, ERR 40 e ERR 510) apresentam potencial para futuros estudos de recomendação de inoculantes, tendo apresentado bons resultados quanto à eficiência simbiótica igual ou superior as estirpes atualmente recomendadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S,F, et al, Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India, **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.4, p. 13-18 2009.

ALMEIDA, A,L,G. et al. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí, **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v,5, p. 364-369, 2010.

ALVES, J, M, A. et al. Avaliação agroeconômica da produção de cultivares de feijão-caupi em consórcio com cultivares de mandioca em Roraima. **Revista Agro@mbiente**, 2009.

ARAUJO, R, S,; HUNGRIA, M, **Microrganismo de Importância Agrícola** - EMBRAPA-CNPAF, Documentos. 44, p. 236, 1994.

ARAUJO, F, F. et al. Fixação biológica de N₂ no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Revista Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, p. 535-540, 2007.

ARDLEY, J, K, *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.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução normativa nº13, de 24 de março de 2011, Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 mar, Seção 1, 3-7, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa n, 30**, de 12 nov, 2010. Diário Oficial da União, Brasília, 17 nov, 2010, Disponível em: <http://www.fiscolex.com.br/doc_13261309>, Acesso em: 25 nov 2013.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, Nono levantamento, junho 2012/Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília: Conab, 2012.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, Nono levantamento, junho 2012/Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília: Conab, 2014.

CHAGAS JUNIOR, A, F.; OLIVEIRA, L, A.; OLIVEIRA, A, N, Caracterização fenotípica de rizóbio nativos estirpes de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi, **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringa, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

CHEN, W, X.; YAN, G, H.; LI, J, L. Numerical taxonomic study of fastgrowing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen, nov, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988.

CHUEIRE, L, M, O. et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16s rRNA, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v, 27, n, 5, 833-840 p, 2003,

COSTA, E, M. et al. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI, **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v, 42, n. 1, p. 1-7, 2011.

COSTA, E, M. et al. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, por estirpes de rizóbio no Pólo de Produção Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, (UFC, Impresso), 2010.

COSTA, J, V, T. Desenvolvimento de nódulos e plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) por métodos destrutivo. **Caatinga**, v, 19, n, 1, p. 11 – 19, 2006.

CHEN, W, M. *Ralstonia taiwanensis* sp, Nov, isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient, **Int, J, Syst, Evol, Microbiol**, 51, p. 1729-1735, 2001,

DE LAJUDIE, P. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp, nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v, 48, n. 2, p. 369-382, 1998.

DREYFUS, B.; GARCIA, J, L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodulans* gen, nov, sp, nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 38, n. 1, p. 89-98, 1988.

EMBRAPA RORAIMA. **Cultivo de Soja no Cerrado de Roraima**, Boa Vista: Embrapa Roraima, p. 67 (Embrapa Roraima, Sistemas de Produção, 1), 2005.

FAO - **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**, Base de Dados, Disponível em: <http://faostat,fao.org/faostat/>, Acesso em: 22 Out 13.

FERNANDES, J, B. et al. Comportamento ambiental e estabilidade produtiva de cultivares de caupi no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, p. 1555-1560, 1990.

FERNANDES, M, F.; FERNANDES, R, P, M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 8, p. 911-920, 2003.

FERREIRA, D, F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia - UFLA**, v. 35, n. 6, p. 1039 – 1042, 2011.

FERREIRA, E, P, B. et al. Nodulação e produção de grãos em feijão-caupi (*vigna unguiculata* [L.] Walp.) inoculado com estirpes de rizóbio. **Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 4, 2011.

FRANCO, A, A.; BALIEIRO, F, C. **Fixação biológica do nitrogênio: Alternativa aos fertilizantes nitrogenados**, In: Siqueira, J, O.; Moreira, F, M, S.; Lopes, A, S.; Guilherme, L, R, G.; Faquin, V.; Furtini Neto, A, E.; Carvalho, J,G, (eds.), Inter-Relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas, Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, p. 577-595. 1999.

FRANK, B, Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen, **Ber Deut, Bot, Ges.**, v, 7, p. 332-346, 1889.

FRED, E, B.; WAKSMAN, S, A. **Yeast Extract - Mannitol agar for laboratory manual of general microbiology**, New York, McGraw Hill, p. 145, 1928.

FREITAS, A, D, S. et al. Caracterização de rizóbios estirpes de jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, **Bragantina**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

GUALTER R, M, R. et al. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.

GRAHAM, P,H. et al. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899, **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p. 198-207, 1994.

GU, C, T. et al. *Rhizobium miluonense* sp, nov, a symbiotic bacterium isolated from Lespedeza root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58, p. 1364–1368, 2008.

GUEDES, G, N. et al. Eficiência agrônômica de inoculantes em feijão-caupi no município de Pombal – PB, **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 4, p. 82 – 89, 2010.

GUIMARÃES, A, A. et al. **Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant**, *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6726–6733, 2012.

HARA, F, A, S.; OLIVEIRA, L, A, Características fisiológicas e ecológicas de estirpes de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba - AM, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.7, p. 667-672, 2005.

HIGGINS, D. et al. **Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**, *Nucleic Acids Res*, 22, p. 4673–4680, 1994.

HOAGLAND, D, R.; ARNON, D, I. **The water-culture method for growing plants without soil**, Irvine: University of California, p. 347, 1950.

HUNGRIA, H.; VARGAS, M, A, T. **Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil**, *Field Crops Research*, 65 (1/2): p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 819-830, 1997.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

JACARD, P. The distribution of flora in the alpine zone, **New Phytologist**, v, 11, p. 37–50, 1912.

JARAMILLO, P, M, D. et al. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon, **Sci, Agric**, v.70, n. 6, p. 397-404, 2013.

JARVIS, B, D, W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov., **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.47, n.3, p. 895-898, 1997.

JESUS, E. C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 769-776, 2005.

JORDAN, D. C. Rhizobiaceae Conn 1938, In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D, BERGEYS'S, **Manual of systematic bacteriology**, London: Willians and Wilkins, p. 234-244, 1982.

KIMURA, M. A. **simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences**. J, Mol, v. 16, p. 111–120, 1980.

LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade de feijão-caupi, **Revista Ceres**, v. 1, n. 293, p. 67-82, 2004.

LEITE, J. et al. 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, n. 5, p. 1215-1226, 2009.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P, A. R.; MOREIRA, F, M, S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp, de solos da Amazônia, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v, 40, n, 11, p. 1095-1104, 2005.

LIAO, C, F, H. Devarda's allow methods for total nitrogen determination, **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v, 45, n, 5, p. 852-855, 1981.

MARTINS, L, M, V. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving yield in the Semi-Arid region of Brazil, **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.

MAYNAUD, G. **Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating Anthyllis vulneraria in mine tailings, and proposal of Aminobacter anthyllidis sp, nov., the first definition of Aminobacter as legume-nodulating bacteria**, Systematic and Applied Microbiology 35, p. 65– 72, 2012.

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

MELO, S, R. **Desempenho da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi em Roraima**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

MELO, S, R.; ZILLI, J, É. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 44, n. 9 p. 1177-1183, 2009.

MENEZES et al. **Importância socioeconômica e condições de cultivo do feijão-caupi em Roraima**, EMBRAPARA-Roraima, In WORKSHOP sobre a Cultura do feijão-caupi em Roraima, Documento 04, 2007.

MIRANDA, T, M. **Diversidade morfológica de bactérias nodulantes de soja e feijão-caupi nos solos de mata e cerrado**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade Cathedral, 2008.

MOREIRA, M, S, F.; SIQUEIRA, O, J. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, Lavras: Editora UFLA, p. 729, 2006.

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria, **Nature**, London, v, 411, 948-950 p. 2001.

D, PANDAY, P.; SCHUMANN AND S, K, DAS. *Rhizobium pusense* sp, nov. isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 61, p. 2632–2639, 2011.

PELCZAR, M, J, E, C, S. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, Pearson Makron Books, Vol, II, São Paulo, 517 p. 2005.

REN, Da, W. et al. *Rhizobium vignae* sp, nov, a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 61, p. 580 – 586, 2011.

RIVAS, R. et al. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L,f) Druce, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, 2002.

RUMJANEK, N, G. et al. Fixação biológica de nitrogênio, In: FREIRE FILHO, F, R, et al, **Feijão Caupi: avanços tecnológicos**, Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 281-335 p. 2005.

SANTOS, V, A, F.; NEVES, M, C, P.; RUMJANEK, N, G. Efficiency of soybean nodules related to rhizobia hydrogenase is influenced by light level, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 15-21, 1996.

SILVA, F,V. et al. Genetic diversity of rhizobia isolates from amazon soils using cowpea (*Vigna Unguiculata*) as trap plant. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012.

SILVA, V, N da. et al. **Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco.** Pesquisa Agropecuária Tropical, n. 37, p. 16-21, 2007.

SILVA, E, C, da. Aproveitamento do nitrogênio (15N) da crotalária e do milheto pelo milho sob plantio direto em Latossolo Vermelho de Cerrado, **Ciência Rural**, v. 36, p. 739-746, 2006.

SOARES, A, L, L. et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG), **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 795-802, 2006.

SOARES, C, S. **Eficiência de estirpes de rizóbio no rendimento e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi** (*Vigna unguiculata* L, Walp), Área, Universidade Federal da Paraíba, p. 110, 2007.

SOUZA, R, A. et al. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 83-91, 2008.

SOUZA, E, F, C.; SORATTO, R, P.; PAGANI, F, A. **Aplicação de nitrogênio e inoculação com rizóbio em feijoeiro cultivado após milho consorciado com braquiária.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, v. 46, n. 4, p. 370-377. 2011.

SY, A. et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v, 183, n. 1, p. 214-220, 2001.

TAMURA K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

TRUJILLO, M, E. et al. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobacterium lupine*, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

VALVERDE, A. *Herbaspirillum lusitanum* sp, nov, a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, p. 1979 -1983, 2003.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, **Microbiological Reviews**, v. 60, 407-438 p, 1996.

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

WEISBURG, W, G.; BARNS, S, M.; PELLETIER, D, A.; LANE, D, J. **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study**, J, Bacteriol, 173:697-703, 1991.

XAVIER, G, R, et al. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v. 19, n. 01, p. 25-33, 2006.

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

ZILLI, J, E. et al. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazônica**, 2009.

ZILLI, J, E. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

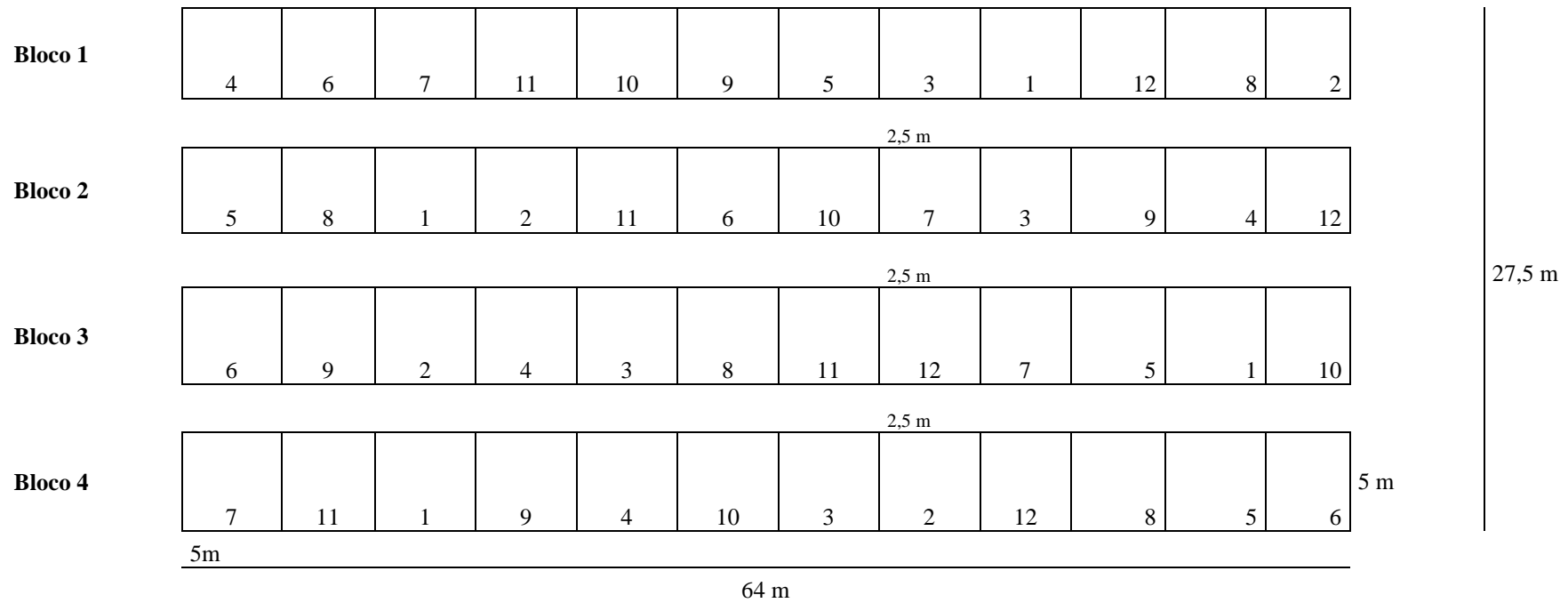
ZILLI, J, E.; VALISHESKI, R, R.; FREIRE FILHO, F, R.; NEVES, M, C, P.; RUMJANEK, N, G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil, **Braz, J, Microbiol**, v, 35, p. 281-287, 2004.

ZILLI, J, E. Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. *Revista Acta Amazônica*, v. 43(2) p. 153 – 160, 2013.

ZILLI, J, E.; VILARINHO, A, A.; ALVES, J, M, A. **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**, Boa Vista: Embrapa Roraima, p. 356, 2009.

Figura 1. Apêndice A - Croqui da área experimento feijão-caupi com estirpes nativas isoladas do solo de Roraima.

Experimento Feijão-caupi com estirpes nativas



Apêndice B – Tabela de caracterização de estirpes isoladas de ambientes de mata e cerrado em Roraima

Tabela 4 - Características morfológicas de estirpes isoladas de solos de Roraima capazes de nodular feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.).

Características das estirpes										
Bactérias	TC	pH	DC	FC	EC	BC	SC	PM	TR	AM
ERR 15	L	AC	5 mm	C	L	I	L	M	T	He
ERR 16	L	AC	6 mm	C	L	I	L	A	T	He
ERR 18	L	AC	1 mm	C	C	I	L	M	T	He
ERR 20	R	AC	5 mm	C	L	I	L	A	T	Ho
ERR 21	I	AC	6 mm	C	C	I	L	A	T	Ho
ERR 22	L	N	2 mm	C	P	I	L	P	T	Ho
ERR 23	L	N	< 1 mm	C	P	I	L	P	T	He
ERR 24	L	N	3 mm	C	L	I	L	M	O	Ho
ERR 25	L	N	2 mm	C	L	I	L	P	T	Ho
ERR 26	I	N	1 mm	C	P	I	L	M	O	Ho
ERR 27	L	N	1 mm	C	P	I	L	P	T	Ho
ERR 29	I	AC	6 mm	C	C	I	L	A	T	He
ERR 30	L	N	< 1 mm	C	P	I	L	P	T	He
ERR 31	L	N	< 1 mm	C	P	I	L	P	T	He
ERR 32	R	AC	2 mm	C	L	I	L	M	T	He
ERR 33	L	N	1 mm	C	P	I	L	P	T	Ho
ERR 34	L	N	2 mm	C	P	I	L	P	T	Ho
ERR 35	L	N	3 mm	I	P	I	L	P	T	Ho
ERR 36	L	N	< 1 mm	C	P	I	L	P	O	Ho
ERR 37	L	AC	4 mm	C	P	I	L	A	T	He
ERR 38	R	AC	3 mm	C	L	I	L	A	T	Ho
ERR 39	L	N	2 mm	C	L	I	L	M	O	Ho
ERR 40	L	N	1 mm	C	P	I	L	M	T	Ho
ERR 41	R	AC	4 mm	C	L	I	L	A	T	Ho
ERR 42	L	N	1 mm	C	P	I	L	M	O	Ho
ERR 43	L	N	1 mm	C	P	I	L	P	T	Ho
ERR 45	L	N	1mm	C	P	I	L	P	T	Ho
ERR 499	L	N	2 mm	C	L	I	L	M	O	Ho
ERR 500	L	N	3 mm	C	P	I	L	P	O	Ho
ERR 501	I	AC	3 mm	C	L	I	L	A	T	He
ERR 502	R	AC	1 mm	C	P	I	L	A	O	Ho
ERR 503	R	AC	4 mm	I	L	O	L	A	T	He
ERR 504	I	AC	5 mm	C	C	I	L	A	T	He
ERR 505	R	AC	3 mm	I	L	O	L	A	T	He
ERR 506	I	AC	4 mm	C	L	I	L	A	T	He
ERR 507	R	AC	4 mm	C	L	I	L	A	T	He
ERR 508	I	AC	5 mm	C	L	I	L	A	T	He
ERR 509	L	AL	< 1 mm	C	L	I	L	P	O	Ho

Continua...

ERR 510	R	N	1 mm	C	P	I	L	P	O	Ho
ERR 511	R	AC	2 mm	C	L	I	L	M	T	He
ERR 512	L	N	< 1 mm	C	P	I	L	P	T	Ho
BR3262	L	N	1 mm	C	P	L	L	P	T	Ho
BR3267	L	N	< 1 mm	C	L	L	L	M	O	Ho

Estirpes da coleção da Embrapa Roraima; TC - tempo de crescimento; (R: rápido de 1-3 dias, I: intermediário de 4-5 dias L: lento 6-10 dias); pH do meio (Ac: ácido, Al: alcalino, N: neutro); DC - diâmetro da colônia em mm; FC - forma da colônia (P: puntiforme, C: circular, I: irregular); EC - elevação da colônia (P: plana, E: elevada, C: convexa,); BC - borda da colônia (I: inteira, O: ondulada); SC - superfície da colônia (L: lisa, R: rugosa); PM - Produção de muco (M: moderado, A: abundante, P: pouco); TR - transparência do muco (O: opaco, T: translúcida); AM - aparência da colônia (Ho: homogênea, He: heterogêneo).

Apêndice C – Imagem de experimento com feijão-caupi

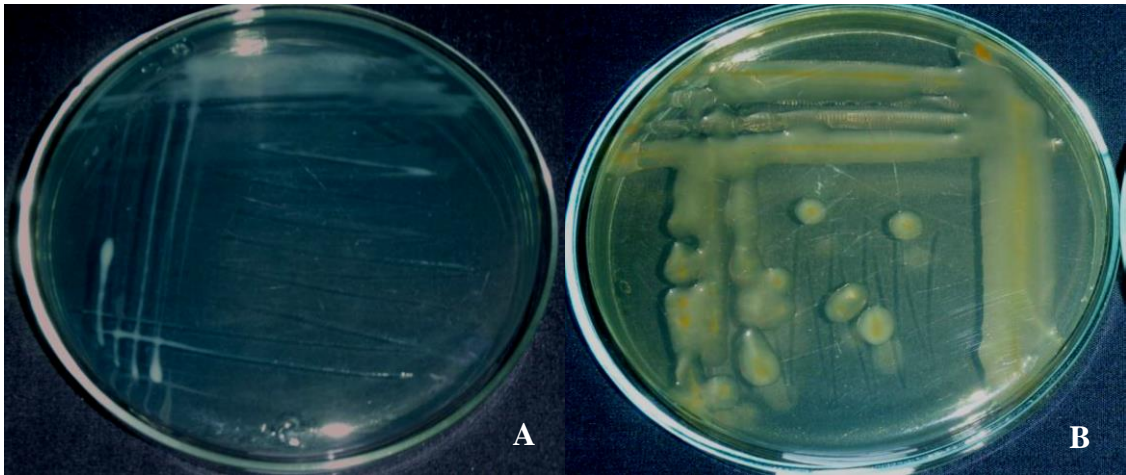
Figura 5 - Experimento em casa de vegetação, comparação do desenvolvimento das plântulas inoculadas com BR 3262 e BR 3267; Nitrogenada (N), controle planta s/ inoculação (C) e planta inoculada com estirpes isolada de ambiente de mata em Roraima (ERR 24).



Fonte: Embrapa Roraima

Apêndice D – Placas de petri com meio de cultura YMA.

Figura 6A e B – Estirpes coletadas de ambiente de mata e cerrado em Roraima, crescidas em meio de cultura YMA, estirpe ERR 42 (A) com pH neutro do meio e moderada produção de muco; estirpe ERR 41 (B) com pH ácido do meio e abundante produção de muco.



Fonte: Embrapa Roraima

Apêndice E – Resumo do quadro da ANAVA

Tabela 9 - Resumo da ANAVA para as variáveis MSPA: matéria seca da parte aérea; NN: número de nódulos; MSN: matéria seca de nódulos; NT: nitrogênio total e Produtividade (Prod.) **Área nova.**

Quadrado Médio (QM)						
Fator de variação	GL	MSPA	NN	MSN	NT	Prod
Tratamento	11	0,115701 ^{ns}	2,136979*	17345,9318*	18,6867*	47946,9794 ^{ns}
Resíduo	33	0,073225	0,839900	2576,8055	4,450222	38940,100
CV (%)	-	10,25	19,80	22,40	15,29	15,87

*, ns, Significativo a 5% de probabilidade e não significativo pelo teste de Scott-Knott, respectivamente.

Apêndice F – Resumo do quadro da ANAVA

Tabela 10 - Resumo da ANAVA para as variáveis MSPA: matéria seca da parte aérea; NN: número de nódulos; MSN: matéria seca de nódulos; NT: nitrogênio total e Produtividade (Prod.) **Área cultivada.**

Quadrado Médio (QM)						
Fator de variação	GL	MSPA	NN	MSN	NT	Prod
Tratamento	11	0,176727 ^{ns}	182,4696*	31,326131*	50,653924*	26435,7447 ^{ns}
Resíduo	33	0,202874	46,1798	7,441272	8,242553	77005,5571
CV (%)	-	15,75	38,70	23,08	18,73	22,65

*, ns, Significativo a 5% de probabilidade e não significativo pelo teste de Scott-Knott, respectivamente.

Apêndice G - Resumo do Blastn de estirpes tipo e estirpes isoladas de ambiente de mata e cerrado em Roraima.

Tabela 5 - Sequências de estirpes depositadas no GenBank utilizadas para análise filogenética dos rizóbios isolados de feijão-caupi.

Estirpes	Número de Bases	Identidade	Organismos	Número de acesso (GenBank)
ERR 15	611	100 %	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	RTU89832
			<i>Rhizobium miluonense</i>	EF061096
			<i>Rhizobium multihospitium</i>	EF035074
ERR 16	352	100%	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	RTU89832
			<i>Rhizobium miluonense</i>	EF061096
			<i>Rhizobium etli</i> bv	U28916
ERR 18	476	100%	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	RTU89832
			<i>Rhizobium miluonense</i>	EF061096
			<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATU16SRDF
ERR 20	504	100%	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	RTU89832
			<i>Rhizobium hainanense</i>	RHU71078
ERR 21	368	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATU16SRDF
			<i>Rhizobium huautlense</i>	AF025852
			<i>Rhizobium pusense</i>	FJ969841
ERR 22	573	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
			<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	AY624135
ERR 23	512	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATU16SRDF
			<i>Rhizobium pusense</i>	FJ969841
ERR 24	525	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
			<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	AY624135
ERR 25	632	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
			<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	AY624135
ERR 26	544	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
			<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	AY624135
ERR 27	518	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
			<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	AY624135
ERR 29	368	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATU16SRDF
			<i>Rhizobium huautlense</i>	AF025852
ERR 30	464	100%	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	U69638
			<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	AF193818
ERR 31	713	100%	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	EU561065
ERR 33	483	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
ERR 34	356	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
ERR 35	500	99%	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	AY624135
			<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000

Continua.....

ERR 36	545	100%	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	X66025
ERR 37	368	100%	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 <i>Rhizobium etli</i>	RTU89832 U28916
ERR 39	408	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
ERR 40	635	100%	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Y624135 U35000
ERR 42	462	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
ERR 43	369	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
ERR 45	448	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
ERR 500	443	100%	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	U35000
ERR 506	349	99%	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 <i>Rhizobium pisi</i>	RTU89832 AY509899
ERR 508	419	100%	<i>Rhizobium miluonense</i> <i>Rhizobium multihospituum</i>	EF061096 EF035074
ERR 509	410	100%	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> <i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	U69638 AF208513 AF193818
ERR 510	433	100%	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	U69638 AF193818
ERR 511	477	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Rhizobium pusense</i>	ATU16SRDF FJ969841
ERR 512	636	100%	<i>Bradyrhizobium canariense</i> <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	AJ558025 AF193818

Fonte: Autor

Anexo A – Tabela de protocolo de preparo da solução de Hoagland e Arnon

Tabela 2 - Composição da solução de Hoagland e Arnon com adaptação utilizada para irrigar os tratamentos do ensaio de eficiência dos rizóbios em plantas de feijão-caupi.

Reagente	Solução Estoque	Alíquota de preparo*
(NH ₄) ₂ HPO ₄	66 g / 500 mL	0,1 mL
KNO ₃	50,55 g / 500 mL	0,6 mL
Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	118,08 g / 500 mL	0,4 mL
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	123,45 g / 500 mL	2 mL
K ₂ SO ₄	36,19 g / 500 mL	3 mL
CaHPO ₄	3,4 g / 500 mL	10 mL
KH ₂ PO ₄	3,47 g / 500 mL	10 mL
Solução de micronutrientes	(2,86 g H ₂ BO ₃ ; 1,81 g MnCl ₂ , 4H ₂ O; 0,22 g ZnSO ₄ , 7H ₂ O; 0,08g CuSO ₄ , 5H ₂ O; 0,028 g Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O), L-1	1 mL
Ca ₂ SO ₄	1,72 g / 4L	4 L
Solução Fe-EDTA	(26,1 g EDTA; 89,2 ml NaOH N; 24 g FeSO ₄ , 7H ₂ O), L-1	1 mL

Fonte: Laboratório de microbiologia – Embrapa Roraima

*Volume referente ao preparo de 4L de solução nutritiva ¼ força