



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM**

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO DE PLANTAS EM NÓDULOS DE FEIJÃO CAUPI  
DAS MESORREGIÕES PERNAMBUCANAS**

**TERESINA  
2023**

**MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM**

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO DE PLANTAS EM NÓDULOS DE FEIJÃO CAUPI  
DAS MESORREGIÕES PERNAMBUCANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – PPGA da Universidade Federal do Piauí – UFPI, na área de concentração Manejo do Solo e Água e linha de pesquisa Microbiologia do solo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

**TERESINA  
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial CCA  
Serviço de Representação da Informação

A524b Amorim, Marineide Rodrigues do.  
Bioprospecção de bactérias promotoras de crescimento de plantas em nódulos de feijão caupi das mesorregiões pernambucanas / Marineide Rodrigues do Amorim. -- 2023.  
107 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Teresina, 2023.  
“Orientador: Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo.”

1. *Vigna unguiculata* L.(Walp). 2. Metagenômica. 3. Caracterização polifásica. 4. Bactérias promotoras de crescimento. I. Araújo, Ademir Sérgio Ferreira de. II. Título.

CDD 635.6592

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM**

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE  
PLANTAS EM NÓDULOS DE FEIJO CAUPI DAS MESORREGIÕES  
PERNAMBUCANAS**

Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

APROVADA em 27 de janeiro de 2023

Comissão Julgadora:

Documento assinado digitalmente  
 MARIA LUIZA RIBEIRO BASTOS DA SILVA  
Data: 31/01/2023 14:22:22-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva - IPA**

*Elaine Martins da Costa*

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Martins da Costa – UFPI**

Documento assinado digitalmente  
 JADSON EMANUEL LOPES ANTUNES  
Data: 06/02/2023 18:34:37-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes – UFPI**

Documento assinado digitalmente  
 ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO  
Data: 01/02/2023 14:08:16-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto – UFRPE**

Documento assinado digitalmente  
 ADEMIR SERGIO FERREIRA DE ARAUJO  
Data: 10/02/2023 17:29:00-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo – UFPI/Presidente  
(Orientador)**

**TERESINA-PI  
2023**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo, pela confiança, oportunidade, ensinamento e paciência ao longo desse tempo.

A minha coorientadora Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo pelas orientações, disponibilidade e apoio em todos os momentos.

Ao meu coorientador Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes pela paciência, ensinamentos, conselhos e por sempre estar disponível.

A Dra. Louise Melo, pela amizade, por todo o cuidado, paciência e orientação a mim direcionada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Francisco Alcântara pela parceria de laboratório e colaboração de insumos para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus queridos amigos Tályta, Hildete, Larissa, Janderson, Romário, Rhaiana pela ajuda, pela amizade, pelos momentos de alegria e de descontração, fundamentais em minha vida, deixando os dias e o trabalho mais leve.

Em especial a Sandra Mara e Mayanna por toda ajuda, ensinamentos, compreensão, companheirismo, incentivo e amizade.

A Vânia, Raimundo, Leonardo e Valdenilson por terem me auxiliado na condução do meu experimento e amizade.

A Leudimar por toda sua atenção, dedicação e parceria dentro das atividades de laboratório e por sua amizade. Você é um exemplo de profissional.

A Dona Nilvânia e Ana Célia pela amizade e companhia diária.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para concretização deste sonho meu. Muitíssimo Obrigada.

## DEDICATÓRIA

À Deus, meu Senhor, em quem confio integralmente, pela orientação nas decisões, por me dar força e coragem na dificuldade e por atender minhas orações nos momentos necessários.

A minha família, em especial aos meus pais, Nedy (*in memoriam*) e Francisco, pelo apoio incondicional e compreensão pela minha ausência e mau humor.

As minhas irmãs Dilma, Cleide e familiares pelos conselhos e apoio, por partilhar de todos os momentos dessa trajetória e pela torcida.

*Faça brotar e crescer em você a fé, a paz, o equilíbrio e a gratidão. Edifique a sua vida buscando o que é melhor para si mesmo, sem medo de dizer não ao que em nada acrescenta no seu conhecimento e evolução. Viva segundo os ensinamentos do Cristo, que tanto ensinou sobre o amor ao próximo, a nós mesmos e a Deus. Não desanime, não desista, ore sempre e não pare de trabalhar. Edificar a si mesmo é um processo contínuo que não deve ser interrompido jamais. Tudo muda e se transforma aos poucos, dia após dia, com base no esforço pessoal de cada um. Grandes sonhos são edificados sobre as pilastras que decidimos edificar dentro de nós: força, resistência, coragem, ação... Escrever o futuro e trilhar um caminho leve, cheio de luz, de bênçãos e de vitórias só depende daquilo que decidimos alimentar.*

Lívia Barros Calado

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	8
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE TABELAS .....	14
CAPÍTULO II - Comunidade bacteriana nos nódulos de feijão-caupi cultivados em solos de Pernambuco.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Feijão Caupi.....	17
2.2 Caracterização de bactérias diazotróficas nos nódulos de leguminosas.....	17
2.3 Comunidade bacteriana nos nódulos de leguminosas.....	20
2.5 Condições edafoclimáticas influenciando a comunidade bacteriana nos nódulos...	25
3. REFERÊNCIAS.....	29
4.    CAPÍTULO I: Bioprospecção de bactérias promotoras de crescimento presentes em nódulos de feijão-caupi de três mesorregiões de Pernambuco.....	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	46
4.1    INTRODUÇÃO.....	47
4.2    MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.2.1 Coleta do solo .....	49
4.2.2 Isolamento e purificação dos isolados bacterianos.....	50
4.2.3    Caracterizações morfológica e fisiológica das colônias.....	50
4.2.4    Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos.....	50
4.2.5    Caracterização molecular dos isolados bacterianos.....	51
4.2.5.1 Extração de DNA e sequenciamento.....	51
4.2.5.2 Análises das sequencias.....	51
4.3    RESULTADOS .....	52
4.3.1    Caracterização morfológica e fisiológica .....	53
4.3.2    Caracterização bioquímica .....	54
4.3.4 Caracterização molecular .....	62
5.3    DISCUSSÃO.....	66
5.3.1 Características morfológicas e fisiológicas.....	66
5.3.3 Características bioquímicas .....	68

5.3.4 Caracterização molecular.....	70
6. CONCLUSÃO.....	73
7. REFERÊNCIAS .....	74
8.Capítulo II - Comunidade bacteriana nos nódulos de feijão-caupi cultivados em solos de Pernambuco.....	87
RESUMO.....	87
ABSTRACT.....	88
8.1 INTRODUÇÃO.....	89
8.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	90
8.1.1 Condições do estudo .....	90
8.1.2 Coleta do solo e captura dos nódulos.....	91
8.1.3 Extração e sequenciamento de DNA do solo e dos nódulos.....	92
8.1.4 Processamento dos dados.....	93
8.1.5 Análise dos dados.....	93
8.2 RESULTADOS .....	94
8.3 DISCUSSÃO .....	98
8.4 CONCLUSÃO.....	100
ANEXOS.....	106

## RESUMO

MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM. **Bioprospecção de bactérias promotoras de crescimento de plantas em nódulos de feijão caupi das mesorregiões Pernambucanas.** Total de páginas:108. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2023.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L Walp.) é uma leguminosa que tem a capacidade de se associar com uma grande diversidade de bactérias rizobianas e não rizobianas. Essas bactérias habitam as raízes formando estruturas denominadas nódulos, onde são responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio e consequente promoção do crescimento vegetal. Objetivou-se realizar a avaliação metagenômica e a caracterização polifásica de isolados nativos de nódulos do *Vigna unguiculata* L. em três regiões edafoclimáticas de Pernambuco. O genótipo de feijão-caupi “IPA 206” foi utilizado como planta isca para captura dos isolados, em amostras de solos coletadas de localidades de três regiões distintas de Pernambuco, Brasil: Zona da Mata, Agreste e Sertão. Para análise de metagenômica dez nódulos intactos, ativos e não danificados, por planta, de seis localidades foram selecionados aleatoriamente para extração de DNA. Em seguida as amostras de DNA foram submetidas ao sequenciamento de terceira geração. Para a caracterização polifásica foram obtidas e identificadas 173 bactérias de nove localidades, das quais 111 após coloração de Gram foram identificadas como bastonetes e submetidas a caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica e 42 ao processo de sequenciamento genético. Na análise metagenômica, observou-se uma maior variedade de comunidades bacterianas no solo em relação aos nódulos onde neste houve uma predominância de Proteobactérias, que representaram 99,8% das sequências totais. Uma pequena proporção das sequências foi associada a Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, entre outros. Os resultados das análises polifásicas evidenciam a diversidade morfológica, fisiológica e bioquímica entre as bactérias de nódulos do feijão-caupi entre as regiões avaliadas. Os resultados demonstram que há uma menor riqueza e diversidade bacteriana dentro dos nódulos quando comparados com solos a granel e que as análises filogenéticas foram eficientes na diferenciação dos isolados nde nódulos de feijão-caupi encontrados em solos das três mesorregiões Pernambucanas.

**Palavras chave:** *Vigna unguiculata* L.(Walp), metagenômica, Caracterização polifásica, bactérias promotoras de crescimento.

## ABSTRACT

MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM. **Bioprospecting plant growth-promoting bacteria in cowpea nodules from the mesoregions of Pernambuco.** Total pages:108. Federal University of Piauí, Teresina, 2023

Cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp.) is a legume that has the ability to associate with a wide range of rhizobian and non-rhizobial bacteria. These bacteria inhabit the roots forming structures called nodules, where they are responsible for biological nitrogen fixation and consequent promotion of plant growth. The objective was to perform a metagenomic evaluation and polyphasic characterization of native isolates of *Vigna unguiculata* L. nodules in three edaphoclimatic regions of Pernambuco. The cowpea genotype “IPA 206” was used as a bait plant to capture the isolates, in soil samples collected from locations in three different regions of Pernambuco, Brazil: Zona da Mata, Agreste and Sertão. For metagenomic analysis ten intact, active and undamaged nodules per plant from six locations were randomly selected for DNA extraction. Then the DNA samples were submitted to third-generation sequencing. For the polyphasic characterization, 173 bacteria from nine locations were obtained and identified, of which 111 after Gram staining were identified as rods and subjected to morphological, physiological and biochemical characterization and 42 to the genetic sequencing process. In the metagenomic analysis, a greater variety of bacterial communities was observed in the soil in relation to the nodules, where there was a predominance of Proteobacteria, which represented 99.8% of the total sequences. A small proportion of the sequences were associated with Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, among others. The results of the polyphasic analyzes show the morphological, physiological and biochemical diversity among the bacteria in cowpea nodules between the evaluated regions. The results demonstrate that there is less bacterial richness and diversity within the nodules when compared to bulk soils and that the phylogenetic analyzes were efficient in differentiating isolates from cowpea nodules found in soils of the three mesoregions of Pernambuco.

Keywords: *Vigna unguiculata* L.(Walp), metagenomics, polyphasic characterization, growth promoting bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I: Bioprospecção de bactérias promotoras de crescimento presentes em nódulos de feijão-caupi de três mesorregiões de Pernambuco

**Figura 1.** Localização geográfica dos locais utilizados para coleta dos solos. O mapa foi criado usando QGIS software version 3.12.1 (<https://qgis.osgeo.org>) ----- 50

**Figura 2.** Aspectos morfofisiológicos de isolados bacterianos: Forma (A), elevação (B), borda (C), superfície e aparência (D) das colônias bacterianas; (E) Cor das colônias; (F) Produção de muco; (G) Consistência de muco; (H) Tempo de crescimento bacteriano; e (I) Formação de ácidos e álcalis -----55

**Figura 3.** Respostas bioquímicas de isolados bacterianos coletados em solos do Agreste, Sertão e Zona da Mata de Pernambuco: (A) número de isolados testados separados por áreas de coleta; e (B) porcentagem de isolados bacterianos com respostas positivas a cada teste bioquímico realizado, separados por área de coleta. Em B, 'n' representa o número total de isolados com respostas positivas ao teste bioquímico. AL = Agreste de Lajedo. AC = Agreste de Caruaru. AS = Agreste de Surubim. SMI = Sertão de Moxotó de Ibimirim. SCS = Sertão de Central de Salgueiro. BSF = Belém de São Francisco. SAA = Sertão de Araripe Araripina. VSA = Vitória de Santo Antão. ZMI = Zona da Mata de Itapirema. CMC = Carboximetilcelulose-----56

**Figura 4.** Produção de ácido indol-3-acético (IAA) de isolados bacterianos coletados em solos do Agreste (A-C), Sertão (D-F) e Zona da Mata (G-H) de Pernambuco. Os resultados foram ordenados do maior para o menor em cada área de coleta.-----57

**Figura 5.** Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 37 isolados bacterianos associados ao Feijão-caupi cultivado em solos de quatro localidades (Sertão de Moxotó de Ibimirim, Belém de São Francisco- Sertão de Itaparica, Sertão Central Salgueiro, Sertão de Araripe Araripina) da mesorregião do sertão Pernambucano. O coeficiente de Simple Matching foi utilizado para a construção da matriz de dissimilaridade com bootstrap de 1000 repetições. O estabelecimento dos grupos foi obtido considerando o nível de dissimilaridade de 69%. -----60

**Figura 6.** Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 42 isolados bacterianos associados ao Feijão-caupi cultivado em solos de três localidades (Agreste de Lajedo, Agreste de Surubim e Agreste de Caruaru) da mesorregião do Agreste Pernambucano. O coeficiente de Simple Matching foi utilizado para a construção da matriz de dissimilaridade com bootstrap de 1000 repetições. O estabelecimento dos grupos foi obtido considerando o nível de dissimilaridade de 67%. -----61

**Figura 7.** Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 23 isolados bacterianos associados ao Feijão-caupi cultivado em solos de

duas localidades (Zona da Mata de Itapirema e Vitória de Santo Antão) da mesorregião da Zona da Mata Pernambucana. O coeficiente de Simple Matching foi utilizado para a construção da matriz de dissimilaridade com bootstrap de 1000 repetições. O estabelecimento dos grupos foi obtido considerando o nível de dissimilaridade de 61% -----62

**Figura 8.** Árvore filogenética (gene rRNA 16S) dos isolados + linhagens de referência relacionadas (GenBank – obtidas pelo BLASTn), utilizando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de árvores em que os táxons associados se agruparam (análises Bootstrap com 1000 repetições) é mostrada nos ramos ----- 66

## CAPÍTULO II - Comunidade bacteriana nos nódulos de feijão-caupi cultivados em solos de Pernambuco.

**Figura 1.** Localização geográfica das dos locais utilizados para coleta dos solos. O mapa foi criado usando QGIS software version 3.12.1 (<https://qgis.osgeo.org>). ----- 92

**Figura 2.** Estrutura e diversidade da comunidade bacteriana no solo e nódulos ao longo de três ecorregiões distintas sob cultivo de feijão-caupi com base no gene 16S rRNA. (A) Análise canônica da estrutura da comunidade bacteriana comparando solo e nódulos. (B) Análise de correspondência canônica dos padrões da comunidade bacteriana e parâmetros químicos do solo no solo a granel. (C) Análise de correspondência canônica dos padrões da comunidade bacteriana e parâmetros de desempenho da planta em nódulos de feijão-caupi. As setas nas análises CCA indicam a correlação entre os parâmetros ambientais / da planta e o perfil microbiano. Os asteriscos indicam fatores significativos. ----- 96

**Figura 3.** Diversidade filogenética (A) e riqueza da comunidade bacteriana em nível de OTU (B). As barras de erro representam o desvio padrão. Diferentes letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre cada site com base no teste HSD de Tukey ( $p < 0,05$ ). -----97

**Figura 4.** Composição da comunidade bacteriana no solo e nódulos com base no gene 16S rRNA. (A) abundância diferencial de filos para o solo e nódulos de feijão-caupi. (B) dez principais grupos de bactérias mais abundantes em nódulos. (C) Diagrama de Venn mostrando a proporção de OTUs exclusivos e compartilhados entre o solo e os nódulos. -----98

**Figura 5.** Gráfico de dispersão mostrando a abundância diferencial de OTUs nos nódulos. As comparações são baseadas no teste t de Welch com correção de Benjamini-Hochberg ( $P < 0,05$ ).----- 98

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I: Bioprospecção de bactérias diazotróficas presentes em nódulos de feijão-caupi de três mesorregiões de Pernambuco**

**Tabela 1.** Propriedades do solo nas localidades das mesorregiões de Pernambuco analisadas.-  
----- 54

**Tabela 2.** Grupos de isolados de nódulos do feijão-caupi cultivados em solos de do Sertão de Pernambuco, estabelecidos pelo método de Tocher, com 'base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas.----- 58

**Tabela 3.** Grupos de isolados de nódulos do feijão-caupi cultivados em solos de do Agreste de Pernambuco, estabelecidos pelo método de Tocher, com 'base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas.----- 58

**Tabela 4.** Grupos de isolados de nódulos do feijão-caupi cultivados em solos de do Zona da Mata de Pernambuco, estabelecidos pelo método de Tocher, com 'base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas.----- 58

**Tabela 5:** Identidade dos isolados nódulos de feijão-caupi, com base na sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blastn no GenBank.----- 63

### **CAPÍTULO II - Comunidade bacteriana nos nódulos de feijão-caupi cultivados em solos de Pernambuco.**

**Tabela 1.** Propriedades do solo nas localidades das mesorregiões de Pernambuco analisadas.-  
----- 95

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo ecológico e sustentável importante para a disponibilização de N às plantas. Este processo contribui com a redução da utilização de fertilizantes nitrogenados, economia para o produtor com menor poluição do solo (MAHMUD *et al.*, 2020). Em leguminosas, a FBN é resultado da simbiose entre bactérias diazotróficas e as plantas através de estruturas radiculares conhecidas por nódulos (MARTINEZ-HIDALGO e HIRSCH, 2017).

Dentre as leguminosas conhecidas, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.(Walp)) apresenta grãos ricos em proteínas servindo como importante fonte de alimento (NYAGA e NJERU, 2020; SIMBINE *et al.*, 2021). Apesar de apresentar boa adaptabilidade as regiões quentes, sendo muito importante para o Nordeste brasileiro, os níveis de produtividade ainda são baixos nessa região, em virtude principalmente da baixa fertilidade do solo e disponibilidade de nutrientes, tais como nitrogênio (N) (MARINHO *et al.*, 2017). Neste contexto, a FBN pode contribuir para a melhoria da nutrição nitrogenada da cultura. Entretanto, fatores bióticos e, principalmente, abióticos podem influenciar na FBN em leguminosas e não leguminosas. Dentre os fatores abióticos, as propriedades do solo, temperatura e umidade podem influenciar negativamente ou positivamente a capacidade de FBN (BOUKAR *et al.*; 2018; GUINET *et al.*, 2018). Desta forma, a prospecção e caracterização de microrganismos eficientes na FBN, principalmente em feijão-caupi, pode contribuir para seleção de bactérias com maior capacidade de fixação de N (CHIDEBE *et al.*, 2018; NYAGA e NJERU, 2020; CHAULAGAIN e FRUGOL, 2021).

Embora seja conhecido que os nódulos em leguminosas sejam colonizados por bactérias específicas, conhecidas genericamente por rizóbios, estudos recentes têm verificado um microbioma diverso (MARTINEZ-HIDALGO e HIRSCH, 2017; AMORIM *et al.*, 2022). Isto é importante pois estes microrganismos colonizando os nódulos não somente fixam N, mas podem contribuir para a promoção do crescimento das plantas pela atuação em outros processos. Dentre os principais grupos microbianos encontrados nos nódulos, as Proteobactéria são mais abundantes (CLUA *et al.*, 2018), compreendendo gêneros conhecidos, tais como *Rizhobium* e *Bradyrhizobium* (KOSKEY *et al.*, 2018). Por outro lado, outros gêneros microbianos são encontrados nos nódulos incluindo *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* (PATIL *et al.*, 2017; LEITE *et al.*, 2017).

Neste sentido, os estudos sobre prospecção e caracterização de bactérias presentes nos nódulos de leguminosas devem levar em consideração não somente as Proteobacterias (rizóbios), mas também outros grupos importantes. Assim, as hipóteses deste estudo são: a) os diferentes fatores abióticos podem contribuir para uma maior diversidade de rizóbios nos nódulos de feijão-caupi; b) os nódulos de feijão-caupi abrigam uma comunidade microbiana diversa composta por gêneros de diferentes filos. Para responder estas hipóteses, o objetivo deste estudo consistiu na caracterização polifásica das bactérias presentes em nódulos de feijão-caupi cultivados em solos de três mesorregiões de Pernambuco.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Feijão Caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) também conhecido como feijão-fradinho é uma leguminosa que pertence à família Fabacea, tribo Phaseoleae, gênero *Vigna* e seção *Catjang* (MARECHAL *et al.*, 1978). Essa leguminosa possui um alto valor nutricional (alto teor de proteína e fibra e baixo teor de gordura) sendo uma fonte de alimentação humana e animal (MOHAMMED *et al.*, 2018). O feijão-caupi tem importância econômica mundial com produção anual estimada em 7 milhões de toneladas de grãos secos colhidos em cerca de 14 milhões de hectares (SINGH, 2020), sendo amplamente cultivada em mais de 100 países (MOHAMMED *et al.*, 2018).

No Nordeste brasileiro, a área cultivada de feijão caupi é 8.478,5 hectares com produção estimada de 23 milhões de toneladas (CONAB, 2022). Nesta região, a produção concentra-se nas áreas semiáridas, onde é realizada por pequenos agricultores familiares, principalmente na forma de sequeiro, devido à capacidade do feijão-caupi de tolerar condições de elevada temperatura e baixa disponibilidade de água (DUTRA *et al.*, 2017; SENA *et al.*, 2020). Os genótipos dessa cultura também têm boa adaptabilidade em solos do sertão que são mais férteis que a região semiárida (MARINHO *et al.*, 2017).

Embora possua diversas vantagens, a produtividade do feijão-caupi no Nordeste é muito baixa em comparação as regiões norte e centro-oeste, atingindo apenas 328 kg ha<sup>-1</sup> (FREIRE FILHO, 2011). Um dos fatores limitantes à maior produtividade da cultura nessa região é a disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio. Entretanto, o feijão-caupi pode formar uma associação simbiótica com bactérias fixadoras de N (MARTINS *et al.*, 2003). O processo de fixação de N pode contribuir com 40 a 90% do total de N acumulado pelo feijão-caupi (ALCANTARA *et al.*, 2014). Por outro lado, a espécie tem baixa seletividade podendo se associar com diferentes grupos bacterianos fixadores de N (NUDNGU *et al.*, 2017). Neste sentido, há a necessidade de se caracterizar os simbiontes preferenciais do feijão-caupi nas diferentes condições edafoclimáticas do semiárido.

### 2.2 Caracterização de bactérias diazotróficas nos nódulos de leguminosas

As leguminosas são plantas difundidas em todo o mundo. Elas são capazes de estabelecer uma simbiose com bactérias do solo formadoras de nódulos, chamadas

coletivamente de rizóbios. Além dos rizóbios, algumas bactérias não simbióticas (denominadas de endofíticas) de outros gêneros também foram isoladas de nódulos de leguminosas (MARTINEZ-HIDALGO e HIRSCH, 2017; JOHNSON, 2019; DENG *et al.*, 2020; CHIBEBA *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021).

As bactérias associativas e as endofíticas podem promover o crescimento vegetal sendo conhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (MILIUTE *et al.*, 2015). Dentre elas, temos as diazotróficas que são consideradas as únicas capazes de realizar a FBN, uma vez que possuem a enzima nitrogenase em sua composição (AFZAL *et al.*, 2019).

As bactérias diazotróficas além de promoverem o crescimento vegetal, aumentam a disponibilidade de nutrientes (GUPTA e PANDEY, 2019), induzem a exsudação da raiz (VACHERON *et al.*, 2013), controlam os fitopatógenos, liberam fitormônios, protegem as plantas de estresses bióticos e abióticos (salinidade, seca, toxicidade de metais pesados e desequilíbrio nutricional) (BERG e SMALLA, 2009; KHATOON *et al.*, 2022; LAU *et al.*, 2022). Além disso, ajudam a reduzir o uso de insumos químicos, pois se adaptam facilmente as condições ambientais melhorando as interações planta-microrganismo (VERMA *et al.*, 2013).

Os rizóbios são bactérias diazotróficas Gram-negativas (Proteobacteria) (WANG *et al.*, 2019). Atualmente foram identificados 89 genomas de rizóbios completamente sequenciados, incluindo diferentes linhagens da mesma espécie. Vários gêneros que formam nódulos abrangem espécies simbióticas e não simbióticas (KASCHUK e HUNGRIA, 2017). As características morfológicas e fisiológicas de rizóbios fornecem importantes informações para sua identificação e agrupamento. De um modo geral são classificadas como sendo móveis, não esporuladas e em forma de bastonete (JAIN *et al.*, 2017).

Algumas características são utilizadas para diferenciar os gêneros e espécies. Por exemplo, as bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são colônias de crescimento lento, com forma circular, raramente translúcidas ou opacas, são secas, ácidas e puntiformes. Já as do gênero *Rhizobium* são colônias creme ou branca, circulares, planas, semitranslúcidas ou opacas, gomosas, com produção abundante de muco, ácidas e com crescimento rápido (YATES *et al.*, 2016). Na região Nordeste, análises dos isolados de feijão-caupi de diferentes locais mostraram um aumento na proporção de rizóbios de crescimento rápido, no sentido da costa brasileira para a região semiárida (FREITAS, 2007).

Dentro do grupo das bactérias não rizobianas temos os Firmicutes e Actinobacterias. Os Firmicutes incluem bactérias gram-positivas e bactérias com paredes celulares atípicas. Esse

filo é formado por bactérias que possuem células esféricas, retas, curvas, bastões, helicoidais ou sarcinas, podendo ou não apresentar flagelos (MEGRAN *et al.*, 2020). Compreende espécies aeróbias, facultativas e anaeróbias. O crescimento ótimo da maior parte das espécies se dá em pH neutro, mas podem ser encontradas espécies acidófilas ou alcalífilas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). As actinobactérias são bactérias endofíticas Gram-positivas filamentosas; principalmente aeróbica, anaeróbica facultativa ou anaeróbica (HAZARIKA e THAKUR, 2020). Apresentam variadas formas como coco-bacilos (*Arthrobacter*), cocos (*Micrococcus*), hifas curtas e rudimentares (*Nocardia* spp.) e micélio ramificado (*Streptomyces* spp.) (LI, *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2016).

As características bioquímicas trazem informações importantes sobre o potencial dos rizóbios e não rizóbios de produzir enzimas e hormônios que promovem o crescimento vegetal (YATES *et al.*, 2016). Nos rizóbios as enzimas líticas como protease e lipase lisam fungos patogênicos e paredes celulares bacterianas (PATIL *et al.*, 2017). A enzima celulase é essencial para a infecção bacteriana dos pêlos radiculares e a subsequente liberação da bactéria para o fio de infecção dentro das células do nódulo do hospedeiro (NUNES *et al.*, 2018). Bactérias não rizóbias produtoras de celulase podem facilitar a penetração de cepas de rizóbios nos pêlos radiculares ou nos espaços intercelulares das células radiculares, resultando em aumento do número de nódulos (ETESAMI *et al.*, 2015, ETESAMI e ADL, 2020a).

A catalase é uma das enzimas que atua na proteção da planta contra o estresse químico, ambiental e mecânico, mantendo os níveis de espécies reativas de oxigênio - ROS (KUMARI *et al.*, 2018). As enzimas urease, protease, amilase e gelatinase são enzimas que atuam na formação de nódulos e consequente fixação de nitrogênio, garantindo um melhor desempenho dos rizóbios produtores (KUMARI *et al.*, 2010).

Além das enzimas, os rizóbios e não rizóbios também produzem fitormônios tais como a auxina. O ácido indolacético (IAA) é um fitormônio que está envolvido na promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal (ALEMNEH *et al.*, 2020). Nas endófitas a sua produção também altera as características das raízes (ou seja, alteração da proliferação das raízes, metabolismo e taxa de respiração) para facilitar a absorção de água e nutrientes (ETESAMI e ADL, 2020b). A produção da auxina já foi relatada para rizóbios clássicos do gênero *Rhizobium*, *Ensifer*, (anteriormente *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (VELAZQUEZ *et al.*, 2017).

A solubilização de fosfato é um dos mecanismos responsáveis pela promoção do crescimento de plantas (VELAZQUEZ *et al.*, 2017). A capacidade dos rizóbios de solubilizar

fosfato é conhecida entre os *Mesorhizobium*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Rhizobium* e para a endossimbiótica *Burkholderia* (ANGUS *et al.*, 2013). A capacidade de solubilizar fosfato foi amplamente encontrada em endófitos de nódulos de leguminosas (KHALIFA e ALMALKI, 2015; PANDYA *et al.*, 2015; SAINI *et al.*, 2015).

Outra característica das bactérias endofíticas é sua capacidade de produção de osmoprotetores (ou seja, prolina, poliaminas, glutamato e aminoácidos livres totais) (NASEEM *et al.*, 2018; KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2022). Eles contribuem para a salinidade e tolerância ao estresse hídrico em plantas inoculadas com bactérias não rizobianas (ETESAMI e MAHESHWARI, 2018; ETESAMI e GLICK, 2020; BONATELLI *et al.*, 2021). Essas bactérias diminuem o pH pela produção de ácidos orgânicos e prótons. Auxiliam na exsudação de compostos solúveis, na decomposição da matéria orgânica do solo e na mobilização e mineralização de outros nutrientes (ETESAMI e ADL, 2020b). Podem melhorar a tolerância das leguminosas ao estresse por déficit hídrico produzindo exopolissacarídeos e substâncias húmicas e proteínas criando microambientes controláveis em torno de células microbianas para o intemperismo (ETESAMI, 2022).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) por algumas bactérias não rizobianas melhoram a simbiose leguminosa-rizóbio sob condições estressantes a partir da expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse vegetal por seca e salinidade (ETESAMI e ADL, 2020b; NOORI *et al.*, 2021). São capazes ainda de aumentar a expressão de genes *nod*, a atividade de nitrogenase e a produção de flavonóides, que induz a expressão de genes de nodulação bacteriana (ETESAMI *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-HIDALGO e HIRSCH, 2017). Atualmente, os produtos de maior representatividade são goma xantana, dextrana, gelana, carragenana e pululana. Além da indústria de alimentos, cosmético e fármacos, os EPSs possuem grande potencial de aplicabilidade em formulações de agroquímicos e bioinsumos (CAO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Desta forma, pode-se dizer que os EPS são potenciais bioinsumos de interesse para o agronegócio.

### **2.3 Comunidade bacteriana nos nódulos de leguminosas**

A maioria dos gêneros (cerca de 60%) de leguminosas são capazes de se associar simbioticamente com bactérias formando nódulos (SRENT, 2001). Destes, 97% das espécies pertencem aos *papilionóides*, mais de 90% das espécies *mimosóides* e apenas 23% das espécies de *caesalpinioídes* (GEBREMEDHIN, 2018). A maioria das bactérias noduladoras radiculares de plantas leguminosas (LNB) são membros da classe  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobacteria. Os

rizóbios são classificados em 18 gêneros, dos quais 15 pertencem à classe  $\alpha$ -Proteobacteria, enquanto três gêneros se agrupam em  $\beta$ -Proteobacteria (BANASIEWICZ *et al.*, 2021).

Dentre as espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio temos: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Methylobacterium*, *Devosia*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* e *Shinella*, que são classificado sob  $\alpha$ -Proteobacteria, enquanto *Burkholderia*, *Trinickia* e *Cupriavidus* (anteriormente *Ralstonia*) pertencem a  $\beta$ -Proteobacteria (Leite *et al.*, 2017; Mukhtar *et al.*, 2020) e, finalmente, um gênero *Pseudomonas* é classificado na subclasse  $\gamma$ -Proteobacteria (Verma *et al.*, 2020).

Algumas cepas de rizóbios são capazes de nodular um grande número de leguminosas, enquanto outras cepas podem nodular apenas algumas leguminosas. *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* têm sido destacados por serem noduladas por diferentes gêneros de rizóbios nas  $\alpha$ -proteobactérias, assim como *Burkholderia* nas  $\beta$ -proteobactérias (MARTINEZ-HIDALGO e HIRSCH, 2017). Em três estudos, *Phaseolus lunatus* foi relatado como nodulado por *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, enquanto *Vigna angularis*, *Vigna radiata* e *Vigna subterranea* foram relatados como nodulados por três gêneros de rizóbios separados (ANDREWS e ANDREWS, 2017; CHIBEBA *et al.*, 2020). Dentro do grupo  $\alpha$ -Proteobacteria, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* constituem os gêneros mais abundantes em nódulos de feijão-caupi (LEITE *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2020; NYAGA e NJERU, 2020). Esses dois gêneros bacterianos contribuem eficientemente para suprir de forma total ou parcial o N para as plantas e melhoram a produtividade do feijão-caupi (GALINDO *et al.*, 2021).

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* possuem a habilidade de colonizar pelo menos 24 das 33 famílias de Fabaceae nodulantes, apresentando a maior variedade de hospedeiros entre todos os gêneros de rizóbios (BANASIEWICZ *et al.*, 2021). Importantes leguminosas tais como a soja e o feijão-fava são infectados por diferentes espécies de *Bradyrhizobium* (ORMENO-ORRILLO e MARTÍNEZ-ROMERO, 2019; CHIBEBA *et al.*, 2020). Este gênero possui estabilidade genética (COSTA *et al.*, 2017), pode fixar nitrogênio simbioticamente com leguminosas das subfamílias Papilionoideae e Caesalpinioideae (AVOUNTUUR *et al.*, 2019) e atua em outros processos promotores de crescimento, tais como a solubilização de fosfato e a produção de fitormônios (MARRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA-LONGATTI *et al.*, 2014).

O gênero *Rhizobium* é composto por mais de 90 espécies de bactérias (TONG *et al.*, 2018). As bactérias desse gênero são comumente capazes de nodular o feijão comum como *R. tropici*, *R. etli*, *R. freirei*, *R. leucaenae*, e *R. paranaense* (BONFIM *et al.*, 2021). O gênero *Burkholderia* de  $\beta$ -Proteobacteria contém espécies capazes de induzir nódulos eficazes em diferentes leguminosas, mas também pode viver como endófito em vários nódulos de leguminosas (PEIX *et al.*, 2015). A diversidade de *Burkholderia* com nodulação de mimosoideas é alta e inclui espécies como *B. phymatum*, que é capaz de nodular várias leguminosas importantes, incluindo o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), onde promovem a produção ou manipulação de fitormônios e fornecem nutrientes (POUPIN *et al.*, 2013; MOULIN *et al.*, 2014).

Outros gêneros de bactérias noduladoras de leguminosas são capazes de promover o crescimento vegetal dos hospedeiros dos quais foram isoladas, como por exemplo os nódulos que continuam o gênero *Pantoea* aumentaram a biomassa de amendoim (TAURIAN *et al.*, 2010); *Pseudomonas*, que aumentou os pesos secos da parte aérea e da semente de *Vicia faba* (SAÏDI *et al.*, 2013); *Agrobacterium*, que promove o crescimento do feijão comum (CHIHAOUI *et al.*, 2015); e *Serratia* que aumentou o rendimento de grãos de grão de bico (ZAHEER *et al.*, 2016). Foram relatados ainda que algumas bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella* isoladas de nódulos de amendoim são capazes de promover seu crescimento (IBÁÑEZ *et al.*, 2009) e também promover o crescimento de milho utilizado em rotação com amendoim.

Os estudos demonstram que as bactérias não rizobianas são altamente diversas e abundantes nos nódulos das culturas de leguminosas (MARTÍNEZ-HIDALGO E HIRSCH, 2017; NOORI *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2020). Essas bactérias são capazes de entrar nos nódulos radiculares de leguminosas em associação com bactérias rizobianas infectantes pelos fios de infecção (DENG *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2017). Ji *et al.*, (2014) verificaram a presença de bactérias endofíticas, sendo duas espécies de *Paenibacillus*, três espécies de *Microbacterium*, três espécies de *Bacillus* e quatro espécies de *Klebsiella*.

Os Firmicutes é um filo que se destaca na habilidade de habitar a rizosfera das plantas tanto em solos como na região da endosfera (HASHMI *et al.*, 2020). Dentre os gêneros que pertencem a esse filo temos *Bacillus*, *Salipaludibacillus* e *Sporosarcina*. O gênero *Bacillus* é considerado o mais importante e mais diversificado de bacilos aeróbios formadores de endósporos. Várias espécies de *Bacillus* já foram isoladas de tecidos internos de plantas: *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. endophyticus*, *B. insolitus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*,

*B. pumilus*, *B. siamensis*, *B. subtilis* e *B. velezensis* (REVA *et al.*, 2002). Cepas do gênero Gram-positivo *Bacillus* isoladas de soja aumentaram o número de nódulos, peso do nódulo, peso da parte aérea, peso da raiz, biomassa total, nitrogênio total e rendimento de grãos (BAI *et al.*, 2002, 2003). Diversas linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* sp já foram estudadas e relatadas como produtoras de biopolímeros (CAO *et al.*, 2020). Também, *Bacillus* é o quarto gênero mais presente em inoculante registrado no Brasil, sendo aplicado para cultura de alface, cana-de-açúcar, batata, milho, soja e tomate (MAPA, App Bioinsumos, 2020).

Segundo Kavamura *et al.* (2013), as estirpes do gênero *Bacillus* produzem exopolissacarídeos que contribuem para a sobrevivência, crescimento e desempenho de mudas de *Zea mays* L., aumento da área foliar, caule e massa seca da parte aérea sob estresse hídrico devido a formação de biofilmes. Já o gênero *Sporosarcina* é composto quase inteiramente por espécies em forma de bacilo, enquanto *S. ureae* é a única *Sporosarcina* em forma de coco estabelecida (OLIVER *et al.*, 2018). Se caracteriza por apresentar múltiplos atributos promotores de crescimento de plantas, como produção de sideróforos, solubilização de fosfato, produção de AIA e fixação de nitrogênio (HASHMI *et al.*, 2020).

O filo Actinobactéria é representado por bactérias de vida livre, as que formam relações simbióticas específicas com plantas e endófitos actinobacterianos que podem colonizar alguns ou parte dos tecidos internos de uma planta (HAZARIKA e THAKUR, 2020). Apresentam mais de 200 gêneros distribuídos em cerca de 52 famílias, 25 ordens e 6 classes (SATHYA *et al.*, 2017). As Actinobactérias endofíticas são menos abundantes e sua distribuição é menos conhecida em comparação com as actinobactérias do solo. A densidade populacional e a diversidade de Actinobactérias dependem de seu habitat e das condições climáticas que a influenciam (HAZARIKA e THAKUR, 2020).

Dentre os gêneros que compõem o filo das Actinobactérias podemos citar *Conexibacter* e *Amycolatopsis*. *Conexibacter* é caracterizado por produzir catalase e oxidase e serem capazes de reduzir nitrato a nitrito (MONCIARDINI *et al.*, 2003), enquanto *Amycolatopsis* é uma conhecida bactéria promotora de crescimento de plantas (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2017) que pode aumentar significativamente o crescimento da parte aérea nas plantas (TAMOŠIŪNĖ *et al.*, 2018). Curiosamente, o gênero *Amycolatopsis* é conhecido por produzir muitos tipos de antibióticos tais como Vancomicina, Rifamicina e Tetraciclina atípica (XING *et al.*, 2013; LUKEŽIČ *et al.*, 2019; BETANCUR *et al.*, 2020), que podem ser importantes para proteger as plantas contra patógenos.

## 2.4 Comunidade bacteriana habitando o nódulo de feijão-caupi

O Estado de Pernambuco, localizado no Nordeste do Brasil, apresenta três regiões ecofisiográficas distintas conhecidas como Zona da Mata, Agreste e Sertão, com diferentes condições edafoclimáticas, que exibem diferentes desempenhos na produtividade do feijão-caupi. As diferenças na produtividade têm sido atribuídas aos fatores químicos do solo e as comunidades bacterianas que habitam o solo (LOPES *et al.*, 2021). Existem poucos estudos que relacionam a comunidade bacteriana que habitam essa leguminosa com os diferentes tipos de cobertura vegetal encontrada na região semiárida.

Estudos tem sido desenvolvidos com o objetivo de identificar a diversidade da comunidade bacteriana que habita o feijão-caupi, bem como avaliar como os fatores bióticos e abióticos do solo influenciam na composição, estrutura e diversidade dessa comunidade (MARINHO *et al.*, 2017). A identificação da comunidade bacteriana que habita essa leguminosa visa selecionar estirpes que sejam capazes de nodulação ou vivam em sinergismo com bactérias noduladoras, eficientes na fixação biológica de nitrogênio e sejam tolerantes as condições edafoclimáticas da região que habita.

A identificação dessas estirpes é uma ferramenta que permite que sejam recomendados inoculantes específicos, eficientes e bem adaptados para cada região. Atualmente existem quatro inoculantes de cepas de *Bradyrhizobium* (BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B e UFLA 03-84) de feijão-caupi sendo comercializados no Brasil. No entanto, essas cepas têm baixa resposta produtiva quando utilizado em genótipos de feijão-caupi cultivados em solos da região semiárida do país (ZILLI *et al.*, 2009). Além disso, tem crescido a tecnologia da coinoculação através da combinação de diferentes microrganismos que promovem o crescimento vegetal. Os inoculantes mistos, possuem grande potencial para serem utilizados pelos agricultores como mecanismo para aumentar a produção agrícola (Chibeba *et al.* 2015 ; Bulegon *et al.* 2017; Ferri *et al.* 2017 ).

Estudos de diversidade genética de bactérias que habitam os nódulos de feijão-caupi vem sendo realizados nas regiões produtoras dessa leguminosa. Solos da região amazônica (JAMARILLO *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2017) e da região nordeste (DA SILVA *et al.*, 2021) tem demonstrado possuir alto índice de diversidade genética de bactérias habitando o feijão-caupi. Em solos de Pernambuco Santos *et al.*, (2018), verificaram que a inoculação de *Bradyrhizobium* com bactérias promotoras de crescimento em feijão-caupi sob condições de estresse salino aumentou a produção de enzimas que atuam no sistema antioxidante.

Na região Pernambucana, observa-se que os nódulos de feijão-caupi além de abrigar bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (seu principal simbionte), pode ser habitada por outros grupos bacterianos distribuídos entre rizóbios e endófitos. Cepas de *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* estão entre os tipos bacterianos que podem ser encontrados dentro dos nódulos de feijão-caupi atuando na promoção do crescimento vegetal (CASTRO *et al.*, 2017; LEITE *et al.*, 2017; SUMAN *et al.*, 2018; AMORIM *et al.*, 2022).

## 2.5 Condições edafoclimáticas influenciando a comunidade bacteriana nos nódulos

A formação dos nódulos é um processo altamente regulado, cujo sucesso depende dos fatores bióticos e abióticos (SINDHU *et al.*, 2020). Nos trópicos, a salinização, diminuição do pH, altas temperaturas, fertilidade do solo, textura do solo e a umidade são os principais fatores abióticos que causam a insuficiência de nodulação afetando todas as fases da simbiose e podendo limitar o crescimento e a sobrevivência de rizóbios no solo (ETESAMI, 2022). Podem ainda causar nos rizóbios deleções plasmidiais, rearranjos genômicos e diversidade reduzida (ALMEIDA *et al.*, 2018). A resposta ao estresse pode diferir em organismos semelhantes com diferentes níveis de tolerância ao estresse imposto (SILVA *et al.*, 2017).

A salinidade é um dos fatores abióticos que comprometem o crescimento vegetal e a formação dos nódulos. Ela pode afetar vários processos fisiológicos e bioquímicos, seja por toxicidade direta ou por estresse osmótico (WADHWA *et al.*, 2017). Algumas espécies de leguminosas são capazes de crescer em condições de salinidade moderada e efetivamente aumentar o N disponível (BRUNING *et al.*, 2015), no entanto, sua capacidade de estabelecer simbiose de fixação de nitrogênio depende da tolerância de rizóbios compatíveis ao mesmo estresse (SILVA *et al.*, 2017). A alta salinidade ocasiona a acumulação de certos íons no tecido vegetal em concentrações tóxicas e diminui o enrolamento do pêlo radicular, a formação de fios de infecção, o que compromete a formação de nódulos (ABD-ALLA *et al.*, 2019; ETESAMI, 2022). Segundo Sobti *et al.*, (2015) o gênero *Rhizobium* quando é naturalmente adaptado a ambientes desérticos demonstra ter um bom desempenho na formação de nódulos na raiz de leguminosas que é cultivada em solos com alto teor de sal. Além disso, ele contribui para o crescimento e melhor desempenho da leguminosa. As bactérias endofíticas *Stenotrophomonas maltophilia* e *S. rhizophila* são resistentes ao sal e capazes de fixar nitrogênio ( PARK *et al.*, 2005; BERG *et al.*, 2013 ).

Segundo Ali *et al.*, (2009) as células rizobianas crescem melhor em uma faixa de pH que varia entre 6,0 e 7,0, sendo poucas as estirpes com capacidade de crescimento em pH

abaixo de 5,0. O pH do solo muito baixo ou muito alto afeta significativamente a simbiose, reduzindo o crescimento e desenvolvimento vegetal, e a principal consequência é a deficiência na absorção de nutrientes e na troca de cátions de ambos os parceiros simbióticos (KOPITTKE *et al.*, 2015 ). A acidez do solo interfere na interação leguminosa-rizóbio de diversas outras maneiras tais como: diminui a produção de componentes de nodulação precoce, como flavonóides, fatores Nod e outros componentes de nodulação (MIRANSARI e SMITH, 2007; FERGUSON *et al.*, 2019). Essa redução impede a fixação do rizóbio aos pêlos radiculares e ocasiona a deformação e ondulação dos pêlos radiculares ( Miransari *et al.*, 2006; MIRANSARI e SMITH, 2007; FERGUSON *et al.*, 2019).

Além disso, solos ácidos inibem diretamente a nodulação ao induzir um sinal derivado de leguminosas que suprime sistemicamente a nodulação (LIN *et al.*, 2012 ). Aarons e Graham (1991) afirmam que a acidez pode afetar o crescimento bacteriano, pois em meio ácido há uma diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, além disso, alguns dos seus processos citoplasmáticos são sensíveis à acidez. A acidez do solo é um problema que não se limita aos efeitos do H<sup>+</sup> nas culturas, mas também sobre genes importantes para o crescimento e sobrevivência em condições de baixo pH (FERGUSON *et al.*, 2019).

A temperatura é um dos fatores que mais pode gerar perdas significativas na associação dos microrganismos e as leguminosas e consequente fixação biológica de nitrogênio (GAULTER *et al.*, 2017). Temperaturas elevadas ocasionam a diminuição da infecção dos pêlos radiculares, o tamanho do nódulo, a atividade da nitrogenase, a assimilação de nitrato e a eficiência do nódulo (HUNGRIA e FRANCO, 1993; HUNGRIA e KASCHUK, 2014 ). Já as baixas temperaturas atrasam a nodulação e reduzem a atividade simbiótica a partir da dissimilação de açúcares no nódulo (HANSEN, 2017). As leguminosas tropicais são particularmente sensíveis a baixas temperaturas abaixo de 25°C, o que pode retardar os eventos de nodulação precoce e reduzir a eficiência de fixação de nitrogênio (ZHANG *et al.*, 1995 ).

Os rizóbios adotaram mecanismos de sobrevivência em áreas áridas e semiáridas, que consiste no seu crescimento num curto período de tempo (NYAGA e NJERU, 2020). Segundo estudos de Hungria e Vargas, (2000) os rizóbios têm capacidade de tolerar uma ampla faixa de temperatura, embora seu crescimento varie com a mudança de temperatura. Zahran *et al.*, (2012), obteve 68 isolados tolerantes a vários fatores ambientais, incluindo a seca, que se associavam as leguminosas *Cicer arietinum*, *Lens esculentus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* e *Vicia faba*.

A fertilidade do solo interfere na capacidade das leguminosas fixarem nitrogênio. Solos que possuem baixa fertilidade, a FBN é impulsionada pelo crescimento das plantas devido à escassez de nutrientes. Em solos com alta fertilidade, a FBN dependerá das mudanças nos reservatórios de N mineral do solo (ROMANYA e CASALS, 2020). Esses efeitos dependem da espécie ou cultivar que pode ser afetada pela sensibilidade à disponibilidade de nutrientes do solo, que atuam na seleção ou sobrevivência de certos grupos microbianos (SANTOYO *et al.*, 2017; GUINET *et al.*, 2018).

Dentre os nutrientes que interferem na formação de nódulos em leguminosas, temos o Nitrogênio e o fósforo (LIU *et al.*, 2018). Quando o nitrogênio está em quantidade suficiente no solo fazem com que as leguminosas regulem negativamente o número de nódulos, tamanho e atividade de fixação de nitrogênio (KASPER *et al.*, 2019). Baixos níveis de nitrogênio no solo aumentam a nodulação (VAN NOORDEN *et al.*, 2016). A resposta parece depender da fonte de nitrogênio, onde o nitrato e a amônia têm um forte efeito inibitório no desenvolvimento do nódulo, enquanto a ureia geralmente não, com algumas exceções específicas da espécie, como por exemplo, no feijão-caupi (VIGUE *et al.*, 1977). Os processos de regulação do nitrogênio da nodulação e a regulação da fixação de nitrogênio aparentam ser regulados por diferentes mecanismos (NISHIDA *et al.*, 2018).

Os nódulos de leguminosas têm uma alta exigência de fósforo (P) mineral, o que os torna vulneráveis às deficiências de P do solo. O P é vital nos processos metabólicos de energia que conduzem a fixação simbiótica de N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub> (LE ROUX *et al.*, 2006), sua conversão em N orgânico como aminoácidos e ureídeos, além de afetar a respiração dos bacteróides nos nódulos (VALENTINE *et al.*, 2017). O déficit de fósforo tem sido ainda associado com o menor peso dos nódulos (DIVITO *et al.*, 2014). Com isso, a deficiência de fósforo (P), portanto, é uma restrição crítica para as leguminosas. No entanto, estudos realizados em soja (LE ROUX *et al.*, 2009), *Lupinus angustifolius* (LE ROUX *et al.*, 2006, 2009) e *Trifolium repens* (HOGH-JENSEN *et al.*, 2002), relataram que durante curto prazo, o crescimento de nódulos pode ser mantido mesmo à custa de crescimento radicular e com a deficiência de P. Durante a limitação prolongada de P, o mecanismo de inibição do crescimento do nódulo parece operar inibindo diretamente a nodulação, ou indiretamente reduzindo a oferta de carbono (C) (VALENTINE *et al.*, 2017).

A textura do solo é outro fator que também interfere no processo de nodulação em leguminosas. Solos arenosos têm baixa capacidade de retenção de água e são pobres em nutrientes, o que inibe os processos de nodulação. Esse tipo de solo não é favorável porque,

por possuírem partículas maiores (macroagregados) criam um microambiente muito arejado e seco, o que dificulta uma invasão bacteriana bem-sucedida e simbiose (MOHAMMADI *et al.*, 2012). Além disso, os macroporos ocasionam altas taxas de difusão de oxigênio, o que gera a secura dos pêlos radiculares e das bactérias e prejudica o crescimento e invasão no vegetal (WOLF e ROHRS, 2001). Solos argilosos, retêm mais água do solo do que solos arenosos, apoiando a ideia de sobrevivência dos rizóbios, pois solos argilosos protegem-os contra altas temperaturas, devido sua composição de microagregados (NDUNGU *et al.*, 2018).

A maior riqueza de simbiontes de nódulos radiculares de feijão-caupi em áreas de baixa pluviosidade apoia a ideia de que solos mais secos podem ser mais ricos em rizóbios (NDUNGU *et al.*, 2018). A umidade do solo está diretamente relacionada à capacidade de um organismo de colonizar a rizosfera (SANTOYO *et al.*, 2017). A precipitação está intimamente associada à formação do tipo e estrutura específicos dos solos, especialmente solos áridos ou semiáridos. Bachar *et al.*, (2010) ao estudarem o efeito da chuva em solos áridos e semiáridos, observaram que a abundância de bactérias diminuiu em relação à precipitação; no entanto, a diversidade bacteriana foi independente do gradiente de precipitação. A baixa disponibilidade hídrica impedem a mobilidade e funcionamento dos rizóbios que reduz a formação dos fios de infecção (MNASRI *et al.*, 2007). Solos encharcados diminuem a disponibilidade de oxigênio prejudicando a respiração do nódulo (MINCHIN *et al.*, 2008).

Algumas espécies de leguminosas quando associadas com bactérias conseguem melhorar seu desempenho sob estresse hídrico. A inoculação bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* em arroz promove a tolerância intrínseca dessa leguminosa ao estresse hídrico e estimula a expressão de genes sintéticos de auxina, principalmente na fase de reprodução vegetal (ENEBE e BABALOLA, 2018). *Sinorhizobium meliloti* e *S. medicae*, possuem a capacidade de proteger a leguminosa *Medicago truncatula* da senescência das folhas sob estresse hídrico (STAUDINGER *et al.*, 2016). Em solos encharcados a *Sesbania*, forma nódulos em caules flutuantes presos a raízes adventícias e desenvolve tecido de aerênquima secundário ao redor do nódulo para aumentar a permeabilidade dos gases (STRIKER e COLMER, 2016).

Diante dos fatores abióticos aos quais as leguminosas podem ser submetidas, estudos de identificação e caracterização de rizóbios e não rizóbios com nodulação superior tolerantes a esses fatores estão sendo realizados para que esses vegetais aumentem sua produtividade em condições estressantes (AHMAD *et al.*, 2019; SINDHU *et al.*, 2020). Os fatores que

ocasionam estresse ao vegetal inibindo seu crescimento e nodulação precisam ser estudados de forma abrangente, afim de que diferentes bactérias com características agrícolas importantes possam ser utilizadas para inoculação em leguminosas (SINDHU *et al.*, 2020).

### 3. REFERÊNCIAS

- Aarons, S. R.; Graham, P. H. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli to acidity. In: **Plant-Soil Interactions at Low pH**. Springer, Dordrecht, p. 581-587. 1991.
- Abd-Alla, M. H., Nafady, N. A., Bashandy, S. R., & Hassan, A. A. Mitigation of effect of salt stress on the nodulation, nitrogen fixation and growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by triple microbial inoculation. **Rhizosphere**, v. 10, p. 100148, 2019.
- Afzal I., Shinwari Z.K, Sikandar S., Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological research**, v. 221, p. 36-49, 2019.
- Ahmad, M., Naseer, I., Hussain, A., Zahid Mumtaz, M., Mustafa, A., Hilger, T. H. & Minggang, X. Appraising endophyte–plant symbiosis for improved growth, nodulation, nitrogen fixation and abiotic stress tolerance: An experimental investigation with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Agronomy**, v. 9, n. 10, p. 621, 2019.
- Alcantara, R.M.C.M.D, Xavier, G.R, Rumjanek, N.G, Rocha, M.D.M, & Carvalho, J.D.S. Symbiotic efficiency in parents of Brazilian cultivars of the cowpea. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 1-9, 2014.
- Alemneh, A. A., Zhou, Y., Ryder, M. H., & Denton, M. D. Mechanisms in plant growth-promoting rhizobacteria that enhance legume–rhizobial symbioses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1133-1156, 2020.
- Ali SF, Rawat LS, Meghvansi MK, Mahna SK. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 4, n. 1, p. 13-18, 2009.
- Almeida, A.M.M.; Mendes Filho, P.F.; Garcia, K.G V.; Gomes, V.F.F.; Almeida, C.L. Densidade, caracterização e eficiência de bactérias fixadoras de Nitrogênio em áreas de caatinga degradada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 1, p. 16-21, 2018.
- Amorim, M. R., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., de Souza Oliveira, L. M., Melo, V. M. M., Oliveira, F. A. S., ... & Araujo, A. S. F. Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. **Applied Soil Ecology**, v. 172, p. 104354, 2022.

- Andrews, Mitchell; Andrews, Morag E. Specificity in legume-rhizobia symbioses. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 705, 2017.
- Angus AA, Lee A, Lum MR, Shehayeb M, Hessabi R, Fujishige NA, Yerrapragada S, Kano S, Song N, Yang P, Estrada de los Santos P, de Faria SM, Dakora FD, Weinstock G, Hirsch AM. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macropodium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. **Plant and Soil**, v. 369, n. 1, p. 543-562, 2013.
- Araújo, F. D. C.; Santos, R. M.; Coelho, P. A. O papel do distúrbio na regeneração natural dos ecossistemas florestais. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 14, n. 1, 2016.
- Avontuur, J. R., Palmer, M., Beukes, C. W., Cha. Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here?. **Systematic and applied microbiology**, v. 42, n. 4, p. 427-439, 2019.
- Bachar, A., Al-Ashhab, A., Soares, M. I. M., Sklarz, M. Y., Angel, R., Ungar, E. D., & Gillor, O. Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 2, p. 453-461, 2010.
- Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D. L., & Driscoll, B. T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 230-238, 2002.
- Bai, Yuming; Zhou, Xiaomin; Smith, Donald L. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop science**, v. 43, n. 5, p. 1774-1781, 2003.
- Banasiewicz, J., Lisboa, B. B., da Costa, P. B., Schlindwein, G., Venter, S. N., Steenkamp, E. T. & Stępkowski, T. Culture-independent assessment of the diazotrophic *Bradyrhizobium* communities in the Pampa and Atlantic Forest Biomes localities in southern Brazil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 126228, 2021.
- Berg, G.; Smalla, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS microbiology ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-13, 2009.
- Berg, M. Alavi, C.S. Schmidt, C. Z., D., Egamberdieva, F. K., B.J. L. Biocontrol and osmoprotection for plants under salinated conditions. **Molecular microbial ecology of the rhizosphere**, v. 1, p. 587-592, 2013.
- Betancur, Lu. A.; Forero, A. M.; Vinchira-Villarraga, D. M.; Cárdenas, J. D.; Romero-Otero, A.; Chagas, F. O.; Pupo, M. T.; Castellanos, L.; Ramos, F. A. NMR-based metabolic profiling

to follow the production of anti-phytopathogenic compounds in the culture of the marine strain *Streptomyces sp.* PNM-9. **Microbiological Research**, v. 239, p. 126507, 2020.

Bomfim, C. A., Coelho, L. G. F., do Vale, H. M. M., de Carvalho Mendes, I., Megías, M., Ollero, F. J., & dos Reis Junior, F. B. Brief history of biofertilizers in Brazil: from conventional approaches to new biotechnological solutions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2215-2232, 2021.

Bonatelli, M. L., Lacerda-Júnior, G. V., dos Reis Junior, F. B., Fernandes-Júnior, P. I., Melo, I. S., & Quecine, M. C. Beneficial plant-associated microorganisms from semiarid regions and seasonally dry environments: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 553223, 2021.

Boukar, O., Belko, N., Chamarthi, S., Togola, A., Batiemo, J., Owusu, E., Diallo, M., Haruna, S., Umar, M. L., Olufajo, O. & Fatokun, C. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, p. 415-424, 2019.

Bruning, B., van Logtestijn, R., Broekman, R., de Vos, A., González, A. P., & Rozema, J. Growth and nitrogen fixation of legumes at increased salinity under field conditions: implications for the use of green manures in saline environments. **AoB Plants**, v. 7, 2015.

Bulegon, L. G., Guimarães, V. F., & Laureth, J. C. U. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, p. 343-349, 2016.

Cao, C., Liu, Y., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, Y., Wu, R., & Wu, J. Structural characterization and antioxidant potential of a novel exopolysaccharide produced by *Bacillus velezensis* SN-1 from spontaneously fermented Da-Jiang. **Glycoconjugate Journal**, v. 37, n. 3, p. 307-317, 2020.

Castro, J.L.D., Souza, M.G., Rufini, M., Guimarães, A.A., Rodrigues, T.L., & Moreira, F.M.D.S. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017.

Chaulagain, D.; Frugoli, J. The regulation of nodule number in legumes is a balance of three signal transduction pathways. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 3, p. 1117, 2021.

Chibeba, A. M., Pereira, C. S., Antunes, J. E. L., Ribeiro, R. A., de Almeida Lopes, A. C., Gomes, R. L. F. & Araujo, A. S. F. Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. **Symbiosis**, v. 80, n. 3, p. 279-292, 2020.

Chibeba, A. M., Guimarães, M. D. F., Brito, O. R., Nogueira, M. A., Araujo, R. S., & Hungria, M. Co-inoculation of soybean with Bradyrhizobium and Azospirillum promotes early nodulation. 2015.

Chidebe, Ifeoma N.; Jaiswal, Sanjay K.; Dakora, Felix D. Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) nodulation in three agroecological regions of Mozambique. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 2, p. e01712-17, 2018.

Chihaoui SA, Trabelsi D, Jdey A, Mhadhbi H, Mhamdi R. Inoculation of *Phaseolus vulgaris* with the nodule-endophyte *Agrobacterium* sp. 10C2 affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities and enhances nodulation and growth. **Archives of microbiology**, v. 197, n. 6, p. 805-813, 2015.

Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 125, 2018.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Levantamento CONAB da safra de grãos. 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em 22/04/2022.

Da-Silva, J. R., Alexandre, A., Brígido, C., & Oliveira, S. Can stress response genes be used to improve the symbiotic performance of rhizobia?. **AIMS microbiology**, v. 3, n. 3, p. 365, 2017.

Deng, Z.S., Zhao, L.F., Kong, Z.Y., Yang, W.Q., Lindström, K., Wang, E.T., Wei, G.H. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 3, p. 463-475, 2011.

Deng, Z. S., Kong, Z. Y., Zhang, B. C., & Zhao, L. F. Insights into non-symbiotic plant growth promotion bacteria associated with nodules of *Sphaerophysa salsula* growing in northwestern China. **Archives of microbiology**, v. 202, n. 2, p. 399-409, 2020.

De Oliveira-Longatti, S. M., Marra, L. M., Lima Soares, B., Bomfeti, C. A., Da Silva, K., Avelar Ferreira, P. A., & de Souza Moreira, F. M. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1239-1250, 2014.

- Divito, G. A., & Sadras, V. O. How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. **Field Crops Research**, v. 156, p. 161-171, 2014.
- Dutra, W. F., Soares de Melo, A., Suassuna, J. F., Dutra, A. F., Chagas da Silva, D., & Maia, J. M. Antioxidative responses of cowpea cultivars to water deficit and salicylic acid treatment. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 895-905, 2017.
- Enebe, M. C.; Babalola, O. O. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 18, p. 7821-7835, 2018.
- Etesami, H. Root nodules of legumes: a suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. **Current Research in Biotechnology**, 2022.
- Etesami, H., Adl, S.M. Can interaction between silicon and non-rhizobial bacteria help in improving nodulation and nitrogen fixation in salinity-stressed legumes? A review. **Rhizosphere**, v. 15, p. 100229, 2020a.
- Etesami, H., Adl, S.M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their action mechanisms in availability of nutrients to plants. **Phyto-Microbiome in stress regulation**, p. 147-203, 2020b.
- Etesami, H., Alikhani, H. A., & Mirseyed Hosseini, H. Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacteria. **Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem**, p. 183-258, 2015.
- Etesami, H., Glick, B.R. Halotolerant plant growth-promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 178, p. 104124, 2020.
- Etesami, H., Maheshwari, D.K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 225-246, 2018.
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H. & Gresshoff, P. M. Legume nodulation: the host controls the party. **Plant, cell & environment**, v. 42, n. 1, p. 41-51, 2019.

- Ferri, G. C., Braccini, A. L., Anghinoni, F. B. G., & Pereira, L. C. Effects of associated co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with *Azospirillum brasilense* on soybean yield and growth. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 1, p. 6-11, 2017.
- Freire Filho, F. R. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte. 2011.
- Freitas, S.S. **Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas**. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental, v.1.
- Galindo, F.S., da Silva, E.C., Pagliari, P.H., Fernandes, G.C., Rodrigues, W.L., Biagini, A.L. C., Baratella, E.B., da Silva Júnior, C.A., Moretti Neto, M.J., Silva, V.M., Muraoka, T., Teixeira Filho, M.C.M. Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium sp.* and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103764, 2021.
- Gauthier-Coles, C.; White, R. G.; Mathesius, U. Nodulating legumes are distinguished by a sensitivity to cytokinin in the root cortex leading to pseudonodule development. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1901, 2019.
- Gebremedhin, W. Summary note on nitrogen fixation, legume nodulation and abiotic factors affecting biological nitrogen fixation inside the soil. **Advances in life science and technology**, v. 55, p. 55-60, 2018.
- Guinet, M., Nicolardot, B., Revellin, C., Durey, V., Carlsson, G., Voisin, A-S. Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species. **Plant and Soil**, v. 432, n. 1, p. 207-227, 2018.
- Gupta, S.; Pandey, S. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1506, 2019.
- Hansen, A. P. Legume-Rhizobium Symbioses: Significance for Sustainable Plant Production. In: **Modern tools and techniques to understand microbes**. Springer, Cham, p. 159-182. 2017
- Hashmi, I.; Bindschedler, S.; Júnior, P. Firmicutes. In: **Micróbios Benéficos em Agro-Ecologia**. Imprensa Acadêmica, p. 363-396. 2020.
- Hazarika, S N; Thakur, D. Actinobactérias. In: **Micróbios Benéficos em Agro-Ecologia** . Imprensa Acadêmica, p. 443-476. 2020.

- Høgh-Jensen, H., Schjoerring, J.K. & Soussana, J-F. The influence of phosphorus deficiency on growth and nitrogen fixation of white clover plants. **Annals of Botany**, v. 90, n. 6, p. 745-753, 2002.
- Hungria, M., & Vargas, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field crops research**, v. 65, n. 2-3, p. 151-164, 2000.
- Hungria, M., & Franco, A. A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 149, n. 1, p. 95-102, 1993.
- Hungria, M., & Kaschuk, G. Regulation of N<sub>2</sub> fixation and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 98, p. 32-39, 2014.
- Ibáñez, F, Angelini, J, Taurian, T, Tonelli, ML, Fabra, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, n. 1, p. 49-55, 2009.
- Jain, P.; Pundir, R.K. Recent Trends in Identification and Molecular Characterization of Rhizobia Species. In: **Rhizobium Biology and Biotechnology**. Springer, Cham. p. 135-164. 2017.
- Jaramillo, P.M.D; Guimarães, A.A; Florentino, L.A; Silva, K.B; Nóbrega, R.S.A; & Moreira, F.M.D.S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, v. 70, p. 397-404, 2013.
- Ji, S. H., Gururani, M. A., & Chun, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 83-98, 2014.
- Johnson, G. High throughput DNA extraction of legume root nodules for rhizobial metagenomics. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2019.
- Kaschuk, G., & Hungria, M. Diversity and importance of diazotrophic bacteria to agricultural sustainability in the tropics. In: Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. **Springer**, Cham, p. 269-292. 2017.
- Kasper, S., Christoffersen, B., Soti, P., & Racelis, A. Abiotic and biotic limitations to nodulation by leguminous cover crops in South Texas. **Agriculture**, v. 9, n. 10, p. 209, 2019.
- Kavamura, V.N, Santos, S.N, da Silva, J.L, Parma, M.M, Ávila, L.A, Visconti, A, Zucchi, T.D, Taketani, R.G, Andreote, F.D, de Melo, I.S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria

for plant growth promotion under drought. **Microbiological research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

Khalifa, A.Y.Z, Almalki, M.A. Isolation and characterization of an endophytic bacterium, *Bacillus megaterium* BMN1, associated with root-nodules of *Medicago sativa* L. growing in Al-Ahsaa region, Saudi Arabia. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 1017-1026, 2015.

Khatoun Z., Huang S., Farooq M.A., Santoyo G., Rafique M., Javed S., Gul B. Role of plant growth-promoting bacteria (PGPB) in abiotic stress management. **Mitigation of Plant Abiotic Stress by Microorganisms**, p. 257-272, 2022.

Kopittke, P. M., Moore, K. L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B. J., Blamey, F. P. C., Tollenaere, A. Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 1402-1411, 2015.

Koskey, G.; Mburu, S.W.; Kimiti, J.M.; Ombori, O.; Maingi, J.M.; Njeru, E. M. Genetic characterization and diversity of *Rhizobium* isolated from root nodules of mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 968, 2018.

Krishnamoorthy, R., Roy Choudhury, A., Walitang, D. I., Anandham, R., Senthilkumar, M., & Sa, T. Salt Stress Tolerance-Promoting Proteins and Metabolites under Plant-Bacteria-Salt Stress Tripartite Interactions. **Applied Sciences**, v. 12, n. 6, p. 3126, 2022.

Kumari, B. S., Ram, M. R., & Mallaiah, K. V. Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profiles of *Rhizobium* isolated from Indigofera species. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 133-139, 2010.

Kumari, P., Meena, M., Upadhyay, R. S. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 155-162, 2018.

Lau, S. E., Teo, W. F. A., Teoh, E. Y., & Tan, B. C. Microbiome engineering and plant biostimulants for sustainable crop improvement and mitigation of biotic and abiotic stresses. **Discover Food**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2022.

Le Roux, M.R., Kahn, S. & Valentine, A.J. Nodular adaptations to P deficiency in amino acid and ureide exporting legumes, lupins and soybeans. **Symbioses**, v. 48, p. 102-109, 2009.

Le Roux, M. R., Ward, C. L., Botha, F. C., & Valentine, A. J. The route of pyruvate synthesis under Pi starvation in legume root systems. **New Phytol**, v. 169, p. 399-408, 2006.

- Leite, J., Fischer, D., Rouws, L. F., Fernandes-Júnior, P. I., Hofmann, A., Kublik, S., & Radl, V. Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2064, 2017.
- Li, Q.; Chen, X.; Jiang, Y.; Chenglin, J. Morphological identification of actinobacteria. **Actinobacteria-basics and biotechnological applications**, p. 59-86, 2016.
- Lin, M. H., Gresshoff, P. M., & Ferguson, B. J. Systemic regulation of soybean nodulation by acidic growth conditions. **Plant physiology**, v. 160, n. 4, p. 2028-2039, 2012
- Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N., and Wang, E. Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 8, p. 632-648, 2018.
- Lopes, L.S., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., De Souza Oliveira, L. M., Melo, V. M. M., De Araujo Pereira, A. P., Costa, A. F., Oliveira, J.P., Martínez, C. R., Figueiredo, M. V.B., Araujo, A. S. F. Distinct bacterial community structure and composition along different cowpea producing ecoregions in Northeastern Brazil. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.
- Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., & Chen, Y. Co-existence of rhizobia and diverse non-rhizobial bacteria in the rhizosphere and nodules of *Dalbergia odorifera* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-like and *Burkholderia pyrrocinia*-like strains. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2255, 2017.
- Lukežič, T., Fayad, A. A., Bader, C., Harmrolfs, K., Bartuli, J., Groß, S., & Müller, R. Engineering atypical tetracycline formation in *Amycolatopsis sulphurea* for the production of modified chelocardin antibiotics. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 468-477, 2019.
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 97, 2020.
- MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Aplicativo Bioinsumos Disponível em: plataformas IOS ou android. Acesso em: 11 jun. 2020.
- Maréchal, R.; Mascherpa, J. M.; STainier, F. Etude taxonomique d'un groupe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (*V. unguiculata*) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées pour l'analyse informatique. **Boissiera**, v. 28, p. 1-273, 1978.
- Marinho, R. D. C. N., Ferreira, L. D. V. M., Silva, A. F. D., Martins, L. M. V., NÓbrega, R. S. A., & Fernandes-júnior, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, p. 273-281, 2017.

- Marra, L. M., Oliveira, S. M. D., Soares, C. R. F. S., & Moreira, F. M. D. S. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 603-609, 2011.
- Martínez-Hidalgo, P., Hirsch, A.M. The nodule microbiome: N<sub>2</sub>-fixing rhizobia do not live alone. **Phytobiomes Journal**, v. 1, n. 2, p. 70-82, 2017.
- Martins L. M. V., Xavier G. R., Rangel F. W., Ribeiro J. R. A., Neves M. C. P., Morgado L. B. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and fertility of soils**, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.
- Megrian D, Taib N, Witwinowski J, Beloin C, Gribaldo S. One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide. **Molecular microbiology**, v. 113, n. 3, p. 659-671, 2020.
- Miliute, O. B., D. Baniulis, V. S. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 102, n. 4, p. 465-478, 2015.
- Minchin, F., James, E., & Becana, M. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. In: **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Springer, Dordrecht. p. 321-362. 2008
- Miransari, M., & Smith, D. Overcoming the stressful effects of salinity and acidity on soybean nodulation and yields using signal molecule genistein under field conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, n. 12, p. 1967-1992, 2007.
- Miransari, M., Balakrishnan, P., Smith, D., Mackenzie, A., Bahrami, H., Malakouti, M., & Rejali, F. Overcoming the stressful effect of low pH on soybean root hair curling using lipochitooligosaccharides. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 37, n. 7-8, p. 1103-1110, 2006.
- Mnasri, B., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 1744-1750, 2007.
- Mohammadi, K., Sohrabi, Y., Heidari, G., Khalesro, S., & Majidi, M. Effective factors on biological nitrogen fixation. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 12, p. 1782-1788, 2012.
- Mohammed, M., Jaiswal, S. K., & Dakora, F. D. Distribution and correlation between phylogeny and functional traits of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.)-nodulating microsymbionts from Ghana and South Africa. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2018.

Monciardini, P., Cavaletti, L., Schumann, P., Rohde, M., Donadio, S. *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, n. 2, p. 569-576, 2003.

Moreira, FM.S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. UFLa, 2006.

Moulin, L., Klonowska, A., Caroline, B., Booth, K., Vriezen, JA, Melkonian, R. Sequência completa do genoma de *Burkholderia phymatum* STM815(T), uma ampla gama de hospedeiros e eficiente simbiote fixador de nitrogênio de espécies de *Mimosa*. Suporte. **Ciência Genômica**. v. 9, p.763-774. 2014.

Naseem, H., Ahsan, M., Shahid, M. A., and Khan, N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. **Journal of basic microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1009-1022, 2018.

Ndungu, S. M., Messmer, M. M., Ziegler, D., Gamper, H. A., Mészáros, É., Thuita, M., Vanlauwe, B., Frossard, E., Thonar, C. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 261, p. 161-171, 2018.

Nishida, H., Tanaka, S., Handa, Y., Ito, M., Sakamoto, Y., Matsunaga, S., Suzaki, T. A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.

Noori, F., Etesami, H., Noori, S., Forouzan, E., Salehi Jouzani, G., Malboobi, M.A. Whole genome sequence of *Pantoea agglomerans* ANP8, a salinity and drought stress-resistant bacterium isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) root nodules. **Biotechnology Reports**, v. 29, p. e00600, 2021.

Noori, F., Etesami, H., Zarini, H. N., Khoshkholgh-Sima, N. A., Salekdeh, G. H., & Alishahi, F. Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for Noori salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 162, p. 129-138, 2018.

Ndungu, S. M., Messmer, M. M., Ziegler, D., Gamper, H. A., Mészáros, É., Thuita, M., ... & Thonar, C. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 261, p. 161-171, 2018.

- Nunes, G. D. O., Menezes, K. A. S., Sampaio, A. A., Leite, J., Fernandes Junior, P. I., Seido, S., Zilli, J. E., Martins, L. M. V. Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 612-624, 2018.
- Nyaga, J. W., & Njeru, E. M. Potential of native rhizobia to improve cowpea growth and production in semi-arid regions of Kenya. **Frontiers in Agronomy**, v. 2, p. 28, 2020.
- Oliver, A.; Kay, M.; Cooper, K. K. Comparative genomics of cocci-shaped *Sporosarcina* strains with diverse spatial isolation. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2018.
- Ormeño-Orrillo, E.; Martínez-Romero, E. A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium* genus. **Frontiers in microbiology**, p. 1334, 2019.
- Pandya M, Rajput M, Rajkumar S. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. **Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 80-89, 2015.
- Park, M. Kim, C. Yang, J. Lee, H. Shin, W. Kim, S. Sa, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, v. 160, n. 2, p. 127-133, 2005.
- Patil, A., Kale, A., Ajane, G., Sheikh, R., & Patil, S. Plant growth-promoting *Rhizobium*: mechanisms and biotechnological prospective. In: **Rhizobium biology and biotechnology**. Springer, Cham, p. 105-134. 2017
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., and Bedmar, E. J. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 17-42, 2015.
- Poupin, MJ, Timmermann, T., Vega, A., Zuñiga, A., and Gonzalez, B. Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69435, 2013.
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd\_Allah, E.F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 667, 2017.
- Reva, O.N., Smirnov, V.V., Pettersson, B., Priest, F.G. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 1, p. 101-107, 2002.
- Rocha, S. M. B., Mendes, L. W., de Souza Oliveira, L. M., Melo, V. M. M., Antunes, J. E. L., Araujo, F. F., Hungria, M., Araujo, A. S. F. Nodule microbiome from cowpea and lima

- bean grown in composted tannery sludge-treated soil. **Applied Soil Ecology**, v. 151, p. 103542, 2020.
- Romanyà, J.; Casals, P. Biological nitrogen fixation response to soil fertility is species-dependent in annual legumes. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 546-556, 2020.
- Saïdi S, Chebil S, Gtari M, Mhamdi R. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 1099-1106, 2013.
- Saini R, Dudeja SS, Giri R, Kumar V. Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 1, p. 74-81, 2015.
- Santos, A.D.A, Silveira, J.A.G.D, Bonifácio, A., Rodrigues, A.C, & Figueiredo, M.D.V.B. Antioxidant response of cowpea co-inoculated with plant growth-promoting bacteria under salt stress. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, p. 513-521, 2018.
- Santoyo, G., Pacheco, C. H., Salmerón, J. H., & León, R. H. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. **Spanish journal of agricultural research**, v. 15, n. 1, p. 13, 2017.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., & Gopalakrishnan, S. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2017.
- Sena, P. T. S., do Nascimento, T. R., Lino, J. D. O. S., Oliveira, G. S., Ferreira Neto, R. A., de Freitas, A. D. S., & Martins, L. M. V. Molecular, physiological, and symbiotic characterization of cowpea rhizobia from soils under different agricultural systems in the semiarid region of Brazil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 1178-1192, 2020.
- Simbine, M. G., Jaiswal, S. K., & Dakora, F. D. Diverse symbiovars nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in highly adaptable agro-ecological zones in Mozambique. **Systematic and applied microbiology**, v. 44, n. 4, p. 126220, 2021.
- Sindhu, S., Dahiya, A., Gera, R., & Sindhu, S. S. Mitigation of abiotic stress in legume-nodulating Rhizobia for sustainable crop production. **Agricultural Research**, v. 9, n. 4, p. 444-459, 2020.
- Singh, B. (Ed.). **Cowpea: the food legume of the 21st century**. John Wiley & Sons, 2020.

- Sobti, S., Belhadj, H.A., Djaghoubi, A. Isolation and characterization of the native Rhizobia under hyper-salt edaphic conditions in Ouargla (southeast Algeria). **Energy Procedia**, v. 74, p. 1434-1439, 2015.
- Srent, J.I. **Nodulação em Leguminosas**. Royal Botanic Gardens, Kew Pp. 87. (2001).
- Staudinger, C., Mehmeti-Tershani, V., Gil-Quintana, E., Gonzalez, E. M., Hofhansl, F., Bachmann, G., & Wienkoop, S. Evidence for a rhizobia-induced drought stress response strategy in *Medicago truncatula*. **Journal of proteomics**, v. 136, p. 202-213, 2016.
- Striker, G. G., & Colmer, T. D. Flooding tolerance of forage legumes. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 8, p. 1851-1872, 2017.
- Suman, B., Triveni, S., Latha, P.C., Srilatha, M., & Rani, C.D. Salinity tolerant phosphorous solubilising bacteria from saline soils of Telangana. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 6, p. 175-182, 2018.
- Tamosiun e, I., Stanien' e, G., Haimi, P., Stanys, V., Rugienius, R., Baniulis, D. Endophytic *Bacillus* and *Pseudomonas spp.* modulate apple shoot growth, cellular redox balance, and protein expression under in vitro conditions. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 889, 2018.
- Taurian, T., Anzuay, M. S., Angelini, J. G., Tonelli, M. L., Ludueña, L., Pena, D. & Fabra, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, v. 329, n. 1, p. 421-431, 2010.
- Tong, W., Li, X., Huo, Y., Zhang, L., Cao, Y., Wang, E. & Wei, G. Genomic insight into the taxonomy of *Rhizobium* genospecies that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Systematic and applied microbiology**, v. 41, n. 4, p. 300-310, 2018.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 356, 2013.
- Valentine, A. J.; Kleinert, A.; Benedito, V. A. Adaptive strategies for nitrogen metabolism in phosphate deficient legume nodules. **Plant Science**, v. 256, p. 46-52, 2017.
- Van Noorden, G. E., Verbeek, R., Dinh, Q. D., Jin, J., Green, A., Ng, J. L. P., & Mathesius, U. Molecular signals controlling the inhibition of nodulation by nitrate in *Medicago truncatula*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1060, 2016.
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. H., & Peix, A. The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. In: **Probiotics and plant health**. Springer, Singapore. p. 41-70. 2017.

- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., & Kumar, A. effect of indigenous *mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. **ecological engineering**, v. 51, p. 282-286, 2013.
- Vigue, J. T., Harper, J. E., Hageman, R. H., & Peters, D. B. Nodulation of Soybeans Grown Hydroponically on Urea 1. **Crop Science**, v. 17, n. 1, p. 169-172, 1977.
- Wadhwa Z, Srivastava V, Rani R, Tanvi Makkar K, Jangra S. Isolation and characterization of *Rhizobium* from *Chickpea* (*Cicer arietinum*). **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 6, n. 11, p. 2880-2893, 2017.
- Wang, E.T.; Chen, W.F.; Tian, C.F.; Young, J.P.W.; Chen, W.X. Ecology and Evolution of Rhizobia: Principles and Applications; **Springer**: Cham, Switzerland, 2019; (eBook).
- Wolf, J. J.; Rohrs, J. The influence of physical soil conditions on the formation of root nodules of *Melilotus officinalis* in the montane zone of Rocky Mountain National Park. **European journal of soil biology**, v. 37, n. 1, p. 51-57, 2001.
- Xing, K., Liu, W., Zhang, Y.J., Bian, G.K., Zhang, W.D., Tamura, T., Lee, J.S., Qin, S., Jiang, J.H. *Amycolatopsis jiangsuensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from a coastal plant in Jiangsu, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p. 433-439, 2013.
- Yates RJ, Howieson JG, Hungria M, Bala A, O'Hara GW, Terpolilli J. Authentication of rhizobia and assessment of the legume symbiosis in controlled plant growth systems. In: Howieson JG, Dilworth MJ (eds) Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp 73–108. 2016.
- Zaheer, A., Mirza, B. S., Mclean, J. E., Yasmin, S., Shah, T. M., Malik, K. A., & Mirza, M. S. Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. **Research in Microbiology**, v. 167, n. 6, p. 510-520, 2016.
- Zahran HH, Abdel FM, Yasser MM, Mahmoud AM, Bedmar EJ. Diversity and environmental stress responses of rhizobial bacteria from Egyptian grain legumes. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 10, p. 571-583, 2012.
- Zhang, F., Lynch, D. H., & Smith, D. L. Impact of low root temperatures in soybean [*Glycine max.*(L.) Merr.] on nodulation and nitrogen fixation. **Environmental and experimental botany**, v. 35, n. 3, p. 279-285, 1995.

Zhang, W., Zhao, Y., Zhao, Z., Cheng, X., & Li, K. Structural characterization and induced copper stress resistance in rice of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* LPC-1. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 1077-1088, 2020.

Zilli, J.É.; Marson, L.C.; Marson, B.F.; Rumjanek, N.G.; Xavier, G.R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. *Acta Amazonica*, v.39, p.749-758, 2009.

#### 4. CAPÍTULO I: **Bioprospecção de bactérias promotoras de crescimento presentes em nódulos de feijão-caupi de três mesorregiões de Pernambuco**

### RESUMO

*Vigna unguiculata* (L.) Walp. conhecida como feijão-caupi é uma das espécies do gênero *Vigna* de grande importância econômica, devido seu potencial nutricional, resistência aos estresses ambientais e capacidade de se associar com bactérias simbióticas e endofíticas que promovem o crescimento vegetal. O objetivo do trabalho foi caracterizar a diversidade de bactérias presentes em nódulos de feijão-caupi cultivados em solos de três regiões edafoclimáticas de Pernambuco utilizando caracteres morfofisiológicos, bioquímicos e genéticos. Foram obtidos 173 isolados de nódulos coletados do genótipo feijão-caupi IPA-206, cultivados em solos de nove localidades pertencentes a três regiões ecofisiográficas encontradas no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil: Mata, Agreste e Sertão. Desses isolados 111 após a coloração de Gram foram identificados como bastonetes e submetidos a caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica e 42 foram pré-selecionados para a identificação molecular. A caracterização polifásica exibiu uma diversidade de isolados presentes nas três mesorregiões que podem estar associados aos diferentes tipos de solo de origem. A baixa reatividade dos isolados a maioria das enzimas avaliadas demonstram que os mesmos podem exibir dificuldade na promoção do crescimento vegetal. As análises moleculares baseadas em perfis de restrição de 16S rRNA amplificados mostraram uma variação genética altamente significativa de isolados não rizobianos nas três mesorregiões Pernambucanas representados por oito gêneros encontrados, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Skermanella*, *Brucella*, *Brevibacillus*, *Priestia* e *Bacillus*. Esses resultados demonstram que bactérias não noduladoras que foram efetuadas caracterização taxonômica é um recurso de ação sinérgica com os rizóbios para o aumento de novos inoculantes microbianos mais eficientes para a cultura do feijão-caupi. E as análises morfofisiológicas e bioquímicas foram eficientes na diferenciação dos isolados presentes em nódulos do feijão-caupi encontrados em solos das três mesorregiões de Pernambuco.

**Palavras chaves:** bactérias promotoras de crescimento de plantas, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., diversidade filogenética, caracterização polifásica.

## CHAPTER I: Bioprospecting of growth promoting bacteria present in cowpea nodules from three mesoregions of Pernambuco

### ABSTRACT

*Vigna unguiculata* (L.) Walp. known as cowpea is one of the species of the genus *Vigna* of great economic importance, due to its nutritional potential, resistance to environmental stresses and ability to associate with symbiotic and endophytic bacteria that promote plant growth. The objective of this work was to characterize the diversity of bacteria present in cowpea nodules cultivated in soils of three edaphoclimatic regions of Pernambuco using morphophysiological, biochemical and genetic characters. A total of 173 nodules isolated from the cowpea genotype IPA-206 were obtained, cultivated in soils of nine localities belonging to three ecophysiological regions found in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil: Mata, Agreste and Sertão. Of these isolates, 111 after Gram staining were identified as rods and subjected to morphological, physiological and biochemical characterization and 42 were pre-selected for molecular identification. The polyphasic characterization showed a diversity of isolates present in the three mesoregions that may be associated with the different types of soil of origin. The low reactivity of the isolates and most of the enzymes evaluated demonstrate that they may have difficulty in promoting plant growth. Molecular analyzes based on restriction profiles of amplified 16S rRNA showed a highly significant genetic variation of non-rhizobian isolates in the three mesoregions of Pernambuco represented by eight genera found, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Skermanella*, *Brucella*, *Brevibacillus*, *Priestia* and *Bacillus*. These results demonstrate that non-nodulating bacteria that underwent taxonomic characterization are a resource of synergistic action with rhizobia to increase new, more efficient microbial inoculants for cowpea culture. And the morphophysiological and biochemical analyzes were efficient in differentiating the isolates present in cowpea nodules found in soils of the three mesoregions of Pernambuco.

**Keywords:** plant growth-promoting bacteria, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., phylogenetic diversity, polyphasic characterization.

## 4.1 INTRODUÇÃO

As leguminosas são plantas capazes de associar-se simbioticamente com bactérias (chamadas coletivamente de rizóbios) do solo formando estruturas radiculares específicas denominadas nódulos (SHARMA *et al.*, 2020). Além dos rizóbios, estudos vem demonstrando que nessas estruturas também podem ser encontrados bactérias não simbióticas (denominadas de endofíticas) (MARTINEZ-HIDALGO e HIRSCH, 2017; JOHNSON, 2019; AMORIM *et al.*, 2022). Essas bactérias são capazes de entrar nos nódulos radiculares de leguminosas em associação com bactérias rizobianas infectantes (DENG *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2017).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma leguminosa da família Fabaceae que abriga alta diversidade genética de bactérias rizobianas e não rizobianas. Os principais grupos microbianos encontrados nos nódulos pertencem ao filo das Proteobactérias (CLÚA *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2021), que englobam tanto espécies simbióticas e não simbióticas. Dentre as espécies simbióticas presentes nessa leguminosa destacam-se os gêneros aquelas pertencentes aos gêneros *Rizhobium* e *Bradyrhizobium* (KOSKEY *et al.*, 2018). Estudos tem relatado a presença de bactérias endofíticas coabitando nos nódulos de leguminosas, principalmente do gênero *Pantoea*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Burkholderia* (ZAHEER *et al.*, 2016; PATIL *et al.*, 2017; LEITE *et al.*, 2017; CHIBEBA *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2021).

A diversidade de bactérias encontradas dentro dos nódulos pode ser determinada tanto por fatores abióticos quanto bióticos (CUSTÓDIO *et al.*, 2022). A simbiose é um processo regulado por fatores abióticos como a salinização, diminuição do pH, temperatura elevada, fertilidade, textura e umidade do solo, que podem ocasionar insuficiência na nodulação. Esses fatores afetam as fases da simbiose e limitam o crescimento e sobrevivência das bactérias nodulares simbióticas e endofíticas (ETESAMI, 2022) diminuindo assim a diversidade dessas bactérias (ALMEIDA *et al.*, 2018). A resposta ao estresse imposto a essas bactérias pode diferir em organismos semelhantes com diferentes níveis de tolerância. Os níveis de tolerância estão relacionados aos processos bioquímicos que as bactérias são capazes de realizar (DA SILVA *et al.*, 2017).

As características bioquímicas juntamente com as características morfofisiológicas e moleculares são determinantes para a identificação e agrupamento das bactérias nos seus respectivos gêneros e espécies. Além disso essa caracterização permite identificar as bactérias que possuem características ecologicamente adaptadas para promoção do crescimento de

plantas e melhor fixação de nitrogênio para que possam ser utilizadas como possíveis inoculantes (IBNY *et al.*, 2019, CORDERO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Diversas características bioquímicas que os microrganismos simbióticos e endofíticos desempenham são essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal, através dos processos como: fixação biológica de nitrogênio, proteção contra fitopatógenos e tolerância aos diversos fatores edafoclimáticos aos quais são submetidos (GOUDA *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2021; JIMÉNEZ-MEJÍA *et al.*, 2022). Dentre essas características podem ser citadas: liberação de fitormônios (como auxina, citocinina, ácido abscísico, etileno); solubilização de fosfato; produção de enzimas como catalase, protease, urease, lipase, amilase, carboximetilcelulase; produção de sideróforos (AHEMAD E KIBRET, 2014).

O uso da biologia molecular, é uma ferramenta essencial para o estudo da diversidade de estirpes de bactérias presentes nos nódulos das leguminosas. Por isso tem sido amplamente utilizado para os estudos taxonômicos (WDOWIAK – WROBEL *et al.*, 2017). Ela tem por base as análises do gene 16S rRNA que está presente em todas as bactérias, e se caracteriza por ter regiões conservadas e possuir um tamanho suficiente para análises filogenéticas (TOLEDO *et al.*, 2009). Essas características permitem uma identificação das bactérias a nível de gênero e uma estimativa da distância filogenética. A partir do sequenciamento do gene 16s rRNA é possível a identificação de outras bactérias que nodulam as leguminosas e que não se enquadram dentro do grupo dos rizóbios (VANDAMME *et al.*, 2002, CHIBEBA *et al.*, 2020).

Como os nódulos podem ser habitados tanto por bactérias simbióticas como endofíticas, que atuam na promoção do crescimento vegetal e resistência aos estresses abióticos (Martinez-HIDALGO e HIRSCH, 2017; PAPIK *et al.*, 2020; IDRIS e NOH, 2021), os estudos de prospecção e caracterização devem ser direcionados para ambos os tipos de bactérias. Além disso, existem ainda algumas espécies bacterianas que coabitam os nódulos de leguminosas e cujo papel no hospedeiro ainda não está claro (Beghalem *et al.*, 2017).

A caracterização da população nativa de bactérias diazotróficas que habitam os nódulos de leguminosas é muito importante para se conhecer a biodiversidade e selecionar estirpes que sejam capazes de promover o crescimento vegetal, eficientes na fixação biológica de nitrogênio, atuem na proteção contra fitopatógenos e sejam resistentes as condições adversas (Adediran *et al.*, 2019; Rocha *et al.*, 2020). Para a região Pernambucana esse tipo de caracterização é muito importante, já que os agricultores cultivam o feijão-caupi e usam essa leguminosa como fonte de renda e alimentação.

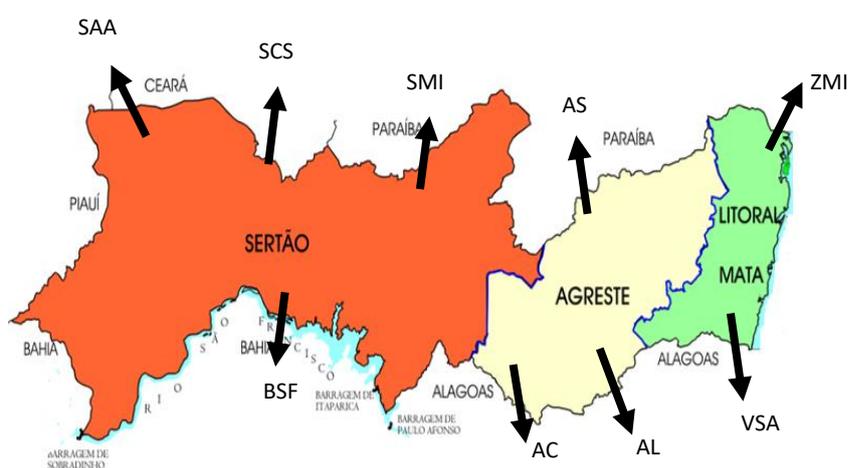
Além nessas localidades de Pernambuco não existem estudos sobre bactérias que habitam o feijão-caupi. O uso de bactérias promotoras de crescimento no feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) por exemplo na região semiárida do Nordeste ainda é incipiente e nas localidades Pernambucanas analisadas nesse trabalho não existem estudos relacionadas a caracterização polifásica desses tipos de bactérias. Com isso há a necessidade de prospectar estirpes específicas para essas regiões Pernambucanas que sejam eficientes e bem adaptadas para que possam ser utilizadas como inoculantes (TAIWO *et al.*, 2018).

Assim as hipóteses deste estudo são: a) as diferentes condições edafoclimáticas podem contribuir para uma maior diversidade de bactérias diazotróficas nos nódulos de feijão-caupi; b) os nódulos de feijão-caupi abrigam uma comunidade microbiana diversa composta por gêneros de diferentes filos. Para responder estas hipóteses, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a variabilidade fenotípica e molecular de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivados em três mesorregiões de Pernambuco.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Coleta do solo

Foram coletados solos referentes as três mesorregiões Pernambucanas: Zona da Mata (municípios de Itapirema e Vitória de Santo Antão); Agreste (municípios de Caruaru, Surubim e Lajedo) e Sertão (municípios de Salgueiro, Belém de São Francisco, Araripina e Ibirimir) (figura 1).



**Figura 1.** Localização geográfica das dos locais utilizados para coleta dos solos. O mapa foi criado usando QGIS software version 3.12.1 (<https://qgis.osgeo.org>).

As amostras compostas de solos foram coletadas ao acaso na camada de 0-20cm (dez sub amostras por local) para compor uma amostra para realização das análises de fertilidade e granulométricas, segundo a metodologia da EMBRAPA (2009).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em Teresina, PI. Como planta isca foram utilizadas sementes de feijão-caupi “IPA 206” fornecida pelo Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco- IPA (Recife-PE).

Foram plantadas cinco sementes por vasos organizados em triplicatas contendo 2kg de solo cada um. Após 15 dias da emergência (DAE) foi realizado o desbaste deixando uma planta por vaso. A colheita das plantas foi efetuada aos 35 dias após o plantio. Após a colheita, as raízes foram lavadas com água corrente, os 10 maiores nódulos foram destacados, preferencialmente da base da raiz e acondicionados em tubos de vácuo com sílica gel, em temperatura ambiente, para posterior procedimento de isolamento.

#### **4.2.2 Isolamento e purificação dos isolados bacterianos**

O isolamento e a purificação das bactérias foram realizados segundo Hungria & Araújo (1994) e Vincent (1970). As colônias de isolados foram repicadas três vezes em meio YMA (Yeast, Manitol, Ágar) com indicador vermelho congo (MARTINS *et al.*, 1997) até a obtenção de colônias puras, livres de contaminação. Em seguida os isolados foram transferidos para o meio de cultura YMA com azul de bromotimol (pH 6,8), para procedimento da caracterização morfológica.

#### **4.2.3 Caracterizações morfológica e fisiológica das colônias**

As características morfológicas observadas foram: forma – tamanho, elevação, bordas, superfície, consistência, estrutura, caracteres ópticos, cromogenia ou pigmentação (MELLONI, 2006). As caracterizações fisiológicas avaliadas foram: tempo de crescimento, formação de ácidos e álcalis, formação de muco, volume do muco, elasticidade do muco (MELLONI, 2006).

#### **4.2.4 Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos**

Os isolados foram submetidos a testes de: coloração de Gram (YANO *et al.*, 1991); produção de urease (ROBERGE e KNOWLES, 1966); protease, carboxil-metil-celulase (CMC) (DEES *et al.*, 1995); amilase (VEDDER, 1915); lipase (RENEWICK *et al.*, 1991); solubilização de fosfatod de cálcio (NAUTIYAL, 1999; VERMA *et al.*, 2001); produção de catalase e teste de gelatinase (YANO *et al.*, 1991) e produção de ácido indol-3- acético (AIA) (SARWAR e KREMER, 1995).

Análises multivariadas das características morfofisiológicas e bioquímicas foram utilizadas para a identificação inicial da diversidade genética de isolados encontrados nessas mesorregiões. Para tal, empregou-se os métodos de agrupamento por otimização (método de Tocher) e os hierárquicos (UPGMA).

#### **4.2.5 Caracterização molecular dos isolados bacterianos**

##### **4.2.5.1 Extração de DNA e sequenciamento**

Um total de 42 isolados os quais exibiram o maior número de resultados positivos para os testes bioquímicos foram selecionados para serem submetidos análise molecular. Os isolados foram cultivados em meio de cultura YM, em seguida, o DNA dos isolados foi extraído utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme recomendações do fabricante. Em seguida diluído e purificado para ser submetido ao processo de PCR (Reação de cadeia de polimerase).

A PCR teve por objetivo confirmar a identificação a nível de gênero onde foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA, para todos os isolados. Os iniciadores utilizados foram *forward* 26F (5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G - 3') e *reverse* 1492R (5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT - 3') (Lane, 1991). Os produtos da PCR previamente purificados foram submetidos ao processo de sequenciamento (Plataforma de sequenciamento LABCEN/CCB/UFPE). As sequências foram confrontadas com a base de dados (Reference RNA sequences) do GenBank (NCBI), utilizando o BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para a identificação dos isolados.

##### **4.2.5.2 Análises das sequencias**

Para a separação dos grupos genotípicos, as sequências do gene 16S rRNA dos isolados, foram alinhadas entre si, utilizando-se o programa Bioedit v.7.0.9.0, e cortadas as extremidades após o alinhamento, usando-se o programa ClustalW, com um bootstrap de 1000 réplicas. Após o corte, ficaram aproximadamente 650 pb, que foram enviadas para o GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI) através do programa Sequin Application version 9.50.

Após o alinhamento e corte do início e fim das sequências que não foram alinhadas, a matriz foi convertida pelo programa MEGA v.7 e as sequências de nucleotídeos foram analisadas pelo código genético padrão. A árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor Joining (NJ) (SAITOU e NEI, 1987), usando-se o teste de filogenia Bootstrap, com 1000 repetições, deleção *pairwise*. Os dendrogramas foram construídos através do programa TreeExplorer.

#### 4.2.6 Autenticação dos isolados

Após as análises fenotípicas e moleculares foi desenvolvido um experimento em casa de vegetação do Laboratório de Solos da UFPI com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv “IPA-206” inoculado com os isolados bacterianos obtidos do experimento planta-isca, visando identificar quais os isolados apresentam capacidade de nodulação.

As plantas foram cultivadas em vasos de Leonard com areia autoclavada com solução nutritiva de Hoagland e Arnon, (1950) modificada conforme Silveira *et. al.*, (1998), isenta de nitrogênio. Como controles foram utilizadas três testemunhas absoluta (TA) não inoculadas e irrigadas por capilaridade com a mesma solução nutritiva.

A colheita foi realizada após 20 dias do plantio. Ao final do período experimental foram medidas o comprimento da planta e das raízes, determinadas as matérias secas da parte aérea e das raízes e verificada a presença ou ausência de nódulos.

### 4.3 RESULTADOS

As propriedades dos solos mostraram grande variabilidade entre as áreas (Tabela 1). O solo do Agreste de Surubim (AS) apresentou maiores valores para a maioria dos parâmetros químicos (pH, P, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, SB, CTC, V) analisados. Por outro lado, os solos das áreas de Zona da Mata (ZMI) exibiram maiores valores de C orgânico. As temperaturas observadas entre as áreas mostraram variação com maiores temperaturas no Sertão e menores no Agreste (Tabela 1).

**Tabela 1.** Propriedades do solo nas localidades das mesorregiões de Pernambuco analisadas.

	Zona da Mata		Sertão		Agreste	
	VSA	ZMI	BSF	SAA	AS	AL
pH	6,4	5,2	6,6	4,5	6,5	6,5
P (mg kg <sup>-1</sup> )	25	13	36	3,0	175	125
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	2,6	0,7	2,4	0,3	4,5	2,1
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	1,3	0,4	0,8	0,4	2,0	0,9
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	0	0,1	0	0,5	0	0
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	0,11	0,04	0,17	0,02	0,07	0,04
K <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	0,28	0,02	0,19	0,03	1,40	0,37
SB (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	4,3	1,3	3,7	0,9	7,7	2,5
CTC (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	6,4	3,5	4,5	4,5	9,7	4,5
V (%)	68	34	81	21	80	66
m (%)	0	8,3	0	62,1	0	0
COT (g kg <sup>-1</sup> )	11	7,5	3,2	4,8	4	8,6
Areia (%)	90	89	75	80	68	63
Silte (%)	2	4	15	1,5	16	15
Argila (%)	8	7	9	19	15	12
Temperatura (°C)	27,5	27	30	31	25	25

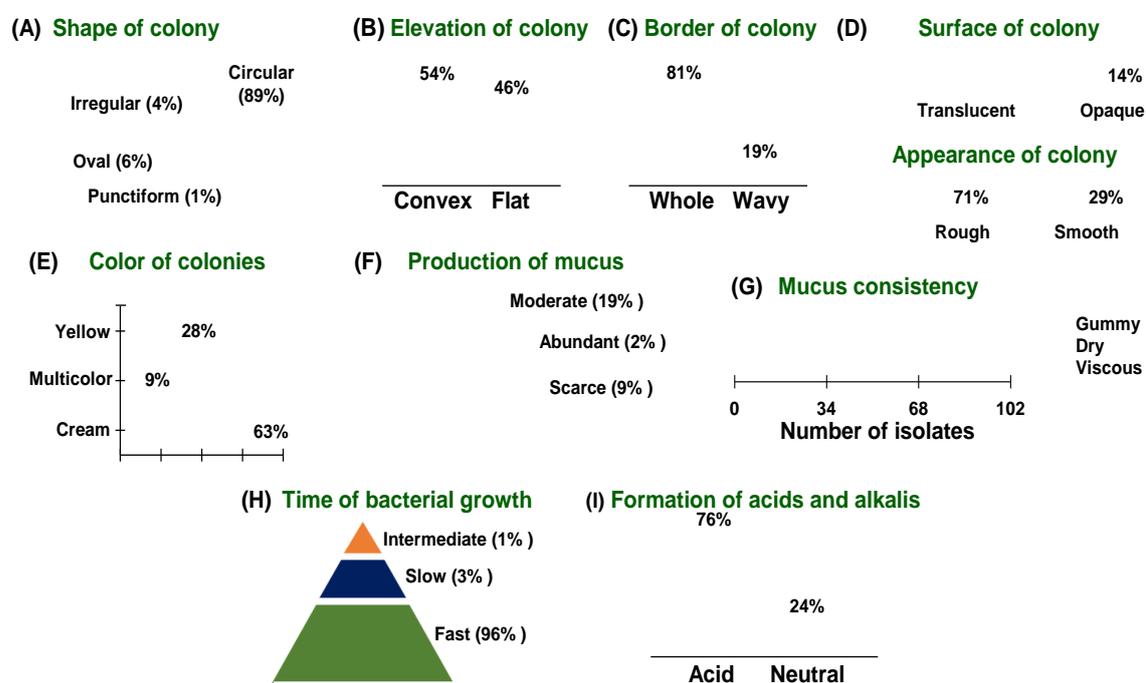
Legenda: SB - soma das bases; CTC - capacidade de troca de catiônica; V (%) - saturação por bases; m (%) - saturação por Al<sup>3+</sup>; COT - carbono orgânico total; VSA - Vitória de Santo Antão; ZMI - Itapirema; AS - Surubim; AL- Lajedo; BSF - Belém do São Francisco; SAA - Araripina.

A partir do processo de isolamento foram obtidos e identificados 173 bactérias extraídas de nódulos de *Vigna unguiculata L.*, distribuídos entre 23 isolados do Agreste de Lajedo (AL), 20 isolados do Agreste de Caruaru (AC), 14 isolados do Agreste de Surubim (AS), 27 isolados do Sertão de Moxotó de Ibimirim (SMI), 19 isolados do Sertão de Central de Salgueiro (SCS), 18 isolados de Belém de São Francisco (BSF), 16 isolados do Sertão de Araripe Araripina (SAA), 15 isolados de Vitória de Santo Antão (VSA), 21 isolados da Zona da Mata de Itapirema (ZMI). Após realizar a coloração de Gram, um total de 111 isolados foram classificados como bactérias Gram-negativas do tipo bastonetes e caracterizados a partir de análises morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

#### 4.3.1 Caracterização morfológica e fisiológica

A maioria dos isolados das três mesorregiões exibiram colônias circulares, translúcidas, com bordas inteiras e de superfície rugosa com elevação das colônias entre

convexas e planas. As análises morfológicas indicaram elevada diversidade entre as bactérias de nódulos do feijão-caupi nos solos das mesorregiões Pernambucanas analisadas (Figura 2).

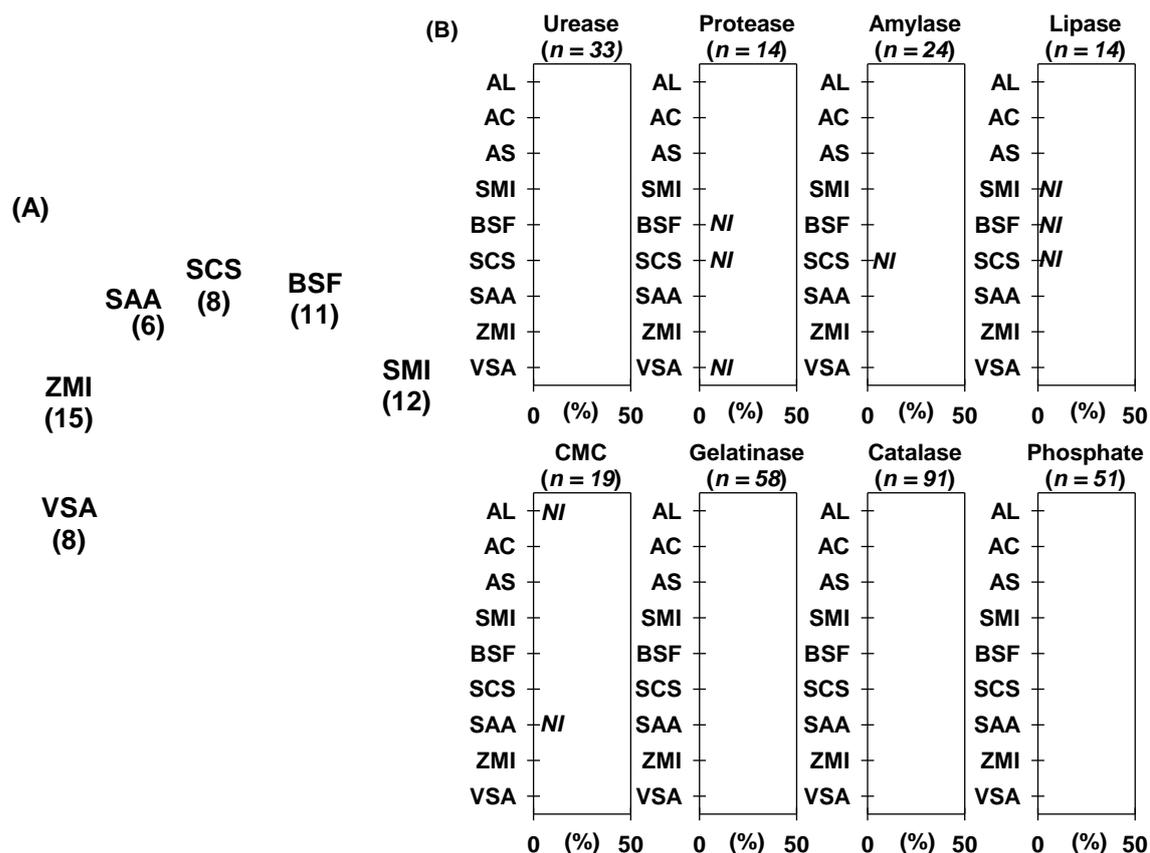


**Figura 2.** Aspectos morfofisiológicos de isolados bacterianos: Forma (A), elevação (B), borda (C), superfície e aparência (D) das colônias bacterianas; (E) Cor das colônias; (F) Produção de muco; (G) Consistência de muco; (H) Tempo de crescimento bacteriano; e (I) Formação de ácidos e álcalis.

Em relação as características fisiológicas houve predominância de colônias de crescimento rápido, acidófilas, de cor creme e com pouca produção de muco. A diferença mais significativa observada foi quanto a produção de muco, nos isolados da região da Zona da Mata que variou de ausência a elevada produção de muco.

### 4.3.2 Caracterização bioquímica

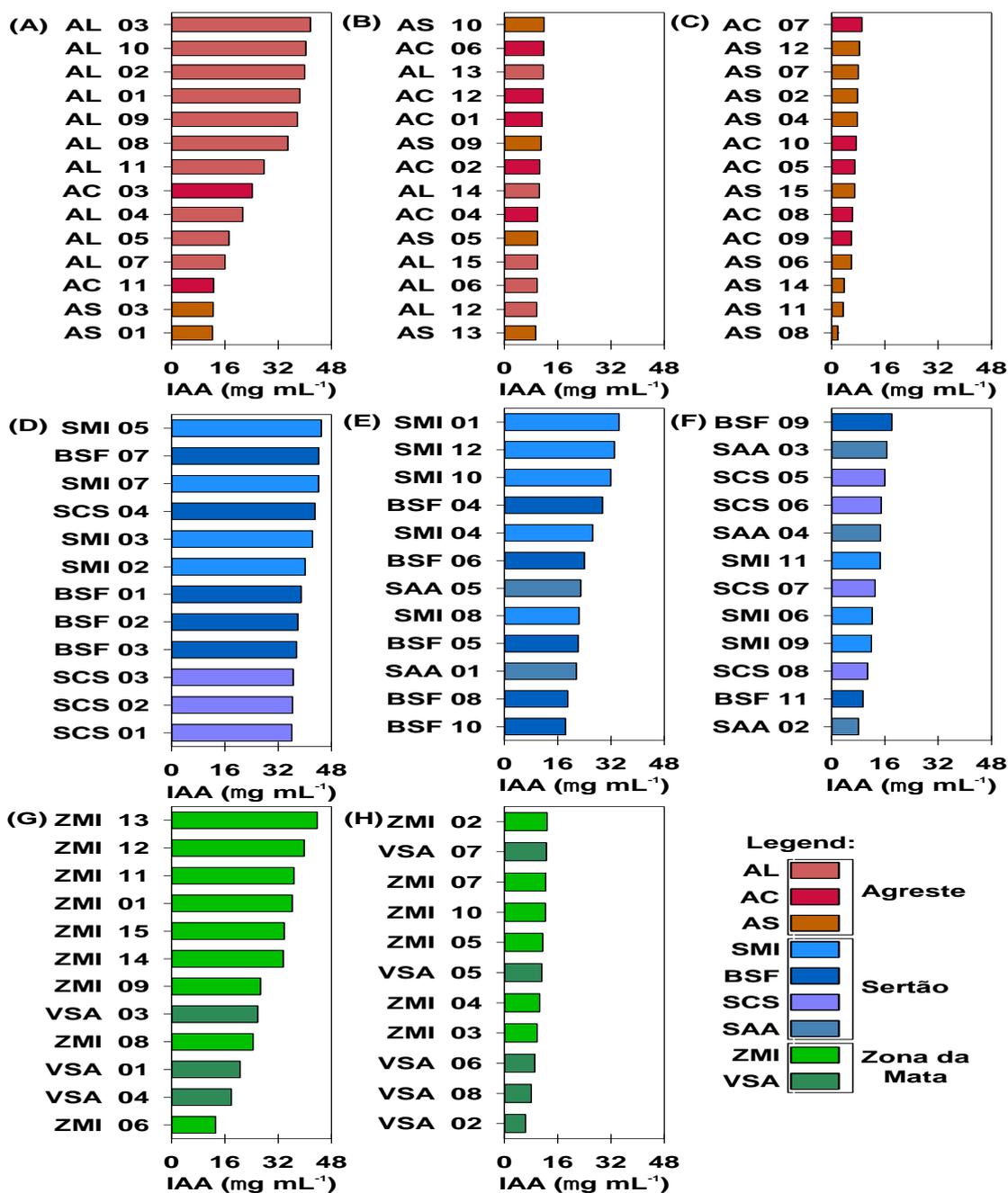
Dentre os 111 isolados classificados como Gram-negativos; 37 do Agreste (15 – AL, 12- AC- 10- AS), 48 isolados do Sertão (12- SMI, 6- SAA, 15- BSF, 15- SCS) e 26 da Zona da Mata (15- ZMI, 11 – VSA), as formas bacterianas observadas foram bastonetes e cocos. As análises bioquímicas demonstraram que os isolados das três mesorregiões exibiram baixa atividade para a maioria dos testes avaliados (Figura 3).



**Figura 3.** Respostas bioquímicas de isolados bacterianos coletados em solos do Agreste, Sertão e Zona da Mata de Pernambuco: (A) número de isolados testados separados por áreas de coleta; e (B) porcentagem de isolados bacterianos com respostas positivas a cada teste bioquímico realizado, separados por área de coleta. Em B, 'n' representa o número total de isolados com respostas positivas ao teste bioquímico. AL = Agreste de Lajedo. AC = Agreste de Caruaru. AS = Agreste de Surubim. SMI = Sertão de Moxotó de Ibirimir. SCS = Sertão de Central de Salgueiro. BSF = Belém de São Francisco. SAA = Sertão de Araripe Araripina. VSA = Vitória de Santo Antão. ZMI = Zona da Mata de Itapirema. CMC = Carboximetilcelulose.

Levando em consideração a habilidade dos isolados de produzirem e liberarem enzimas específicas a partir da formação de halos ao redor das colônias, foi observado que em relação a atividade da urease, lipase, protease, amilase e celulase, os isolados das três mesorregiões de um modo geral exibiram baixa capacidade de degradação dessas enzimas com percentuais abaixo de 50% de seus representantes.

Catalase foi o teste bioquímico com maior número de reações positivas entre os isolados das três mesorregiões avaliadas, com percentual de reatividade acima de 80%. Os testes de gelatinase e solubilização de fosfato demonstraram que somente os isolados das localidades ZMI e VSA tiveram poucos resultados positivos com percentuais abaixo de 50%. Verificou-se que os isolados das três mesorregiões exibiram variação na produção de AIA na presença de L-triptofano (Figura 4).



**Figura 4.** Produção de ácido indol-3-acético (IAA) de isolados bacterianos coletados em solos do Agreste (A-C), Sertão (D-F) e Zona da Mata (G-H) de Pernambuco. Os resultados foram ordenados do maior para o menor em cada área de coleta.

A partir da análise multivariada pelo agrupamento de Tocher verificou-se que os isolados coletados em solos do Sertão foram reunidos em oito grupos de diversidade (A, B, C, D, E, F, G e H), os da mesorregião do Agreste em 11 grupos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K) e os da Zona da Mata em seis grupos (A, B, C, D, E e F) (Tabela 5, 6 e 7, respectivamente).

**Tabela 2.** Grupos de isolados de nódulos do feijão-caupi cultivados em solos de do Sertão de Pernambuco, estabelecidos pelo método de Tocher, com base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas.

GRUPO	ISOLADOS
A	SCS2 SCS4 SMI11 SCS1 SMI4 SMI5 BSF1 BSF2 BSF7 SAA4 SMI10 SMI12 SAA5 BSF3 SAA2 BSF6 BSF8 BSF9 BSF11
B	SMI2 SMI9 SMI1
C	SCS3 SMI6 BSF4
D	SCS8 BSF10 SCS6 BSF5
E	SAA1 SAA3 SCS5
F	SMI8 SMI11
G	SAA6
H	SMI7

**Tabela 3.** Grupos de isolados de nódulos do feijão-caupi cultivados em solos de do Agreste de Pernambuco, estabelecidos pelo método de Tocher, com base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas.

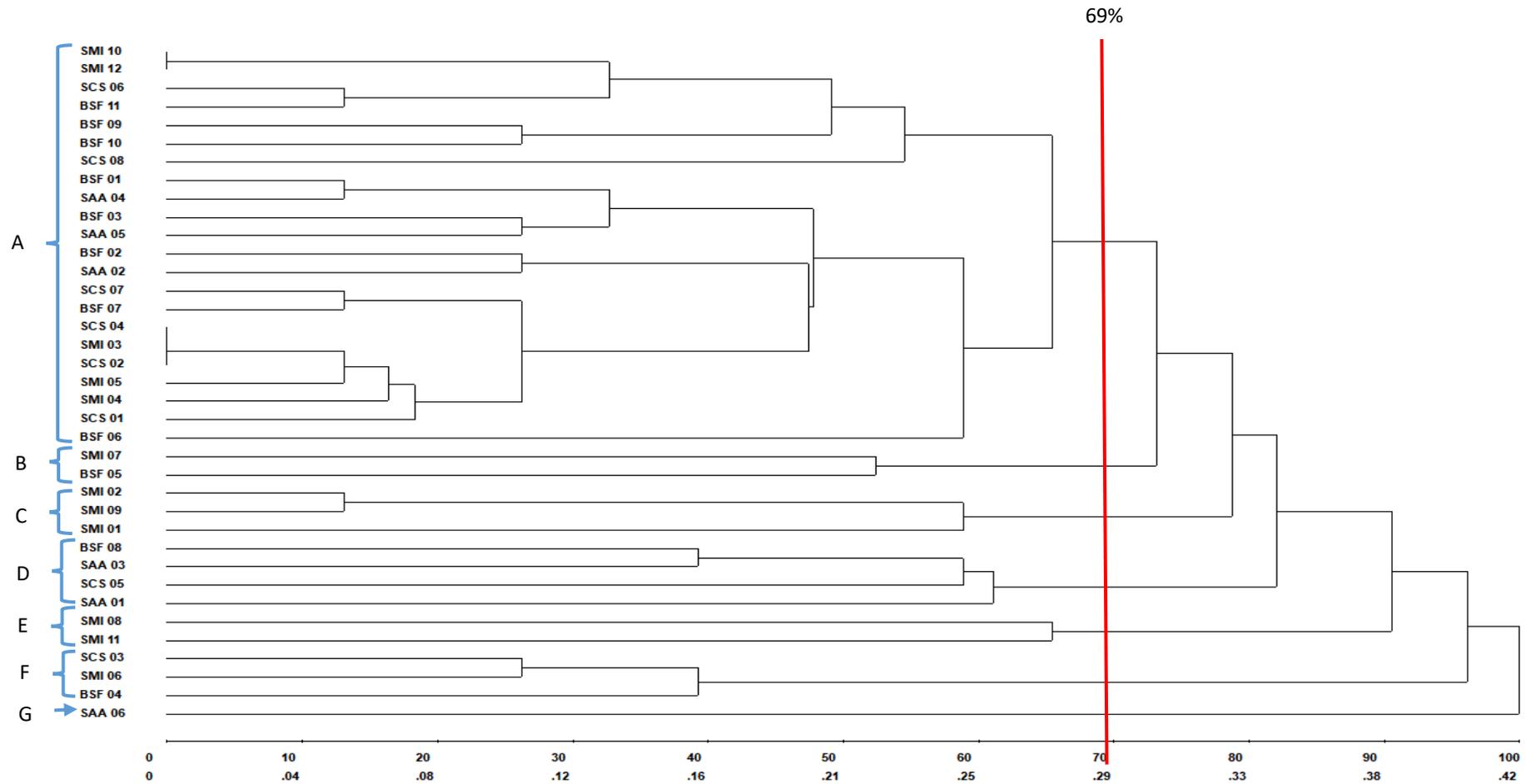
GRUPO	ISOLADOS
A	AL2 AL5 AS4 AL3 AL7 AC2 AL8 AC13 AC3 AC12 AS1 AC6 AL13 AC14 AL4 AL9 AL15 AC15 AL14 AS12 AL10 AC1 AC5 AS11 AS10
B	AS5 AC7
C	AS6 AS8 AS3 AC10
D	AL1 AC4
E	AL6 AL12
F	AS2 AC8
G	AS9
H	AC9
I	AC11
J	AL11
K	AS7

**Tabela 4.** Grupos de isolados de nódulos do feijão-caupi cultivados em solos de do Zona da Mata de Pernambuco, estabelecidos pelo método de Tocher, com base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas.

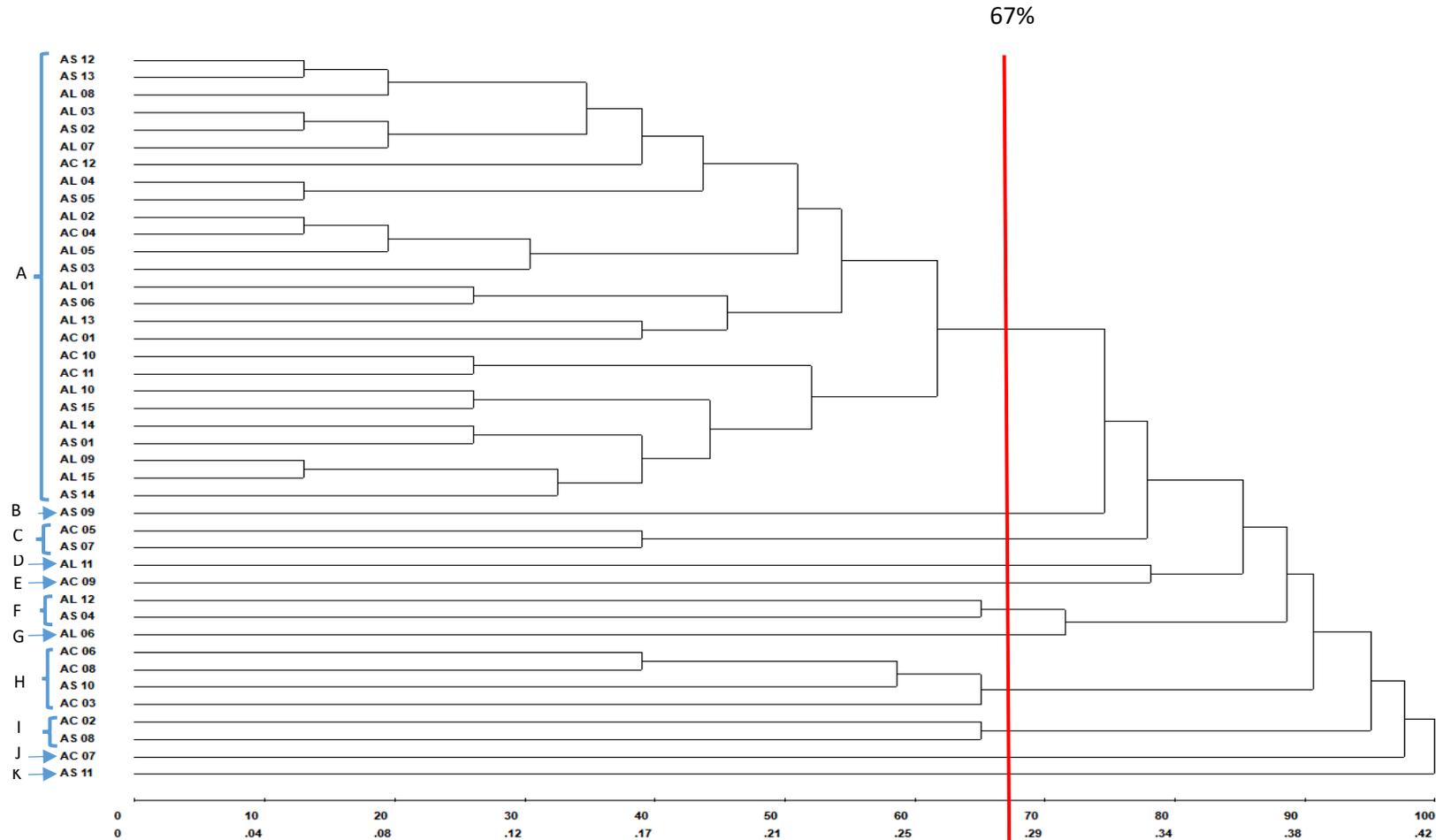
GRUPO	ISOLADOS
A	ZMI1 VSA8 VSA7 ZMI6 ZMI5 ZMI8 ZMI7 ZMI4 VSA3 ZMI2
B	ZMI14 ZMI15 VSA1 ZMI11 ZMI9 ZMI10
C	ZMI12 VSA4
D	VSA2 VSA5 VSA6
E	ZMI3
F	ZMI13

A análise pelo método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean) através da construção de dendrograma (Figura 5, 6 e 7) de cada mesorregião demonstrou que no Agreste e na Zona da Mata a quantidade de perfis filogenéticos é igual ao total de diversidade genética inicial. No Agreste observou-se ainda um aumento no número de grupos monofiléticos em comparação com o método de Tocher.

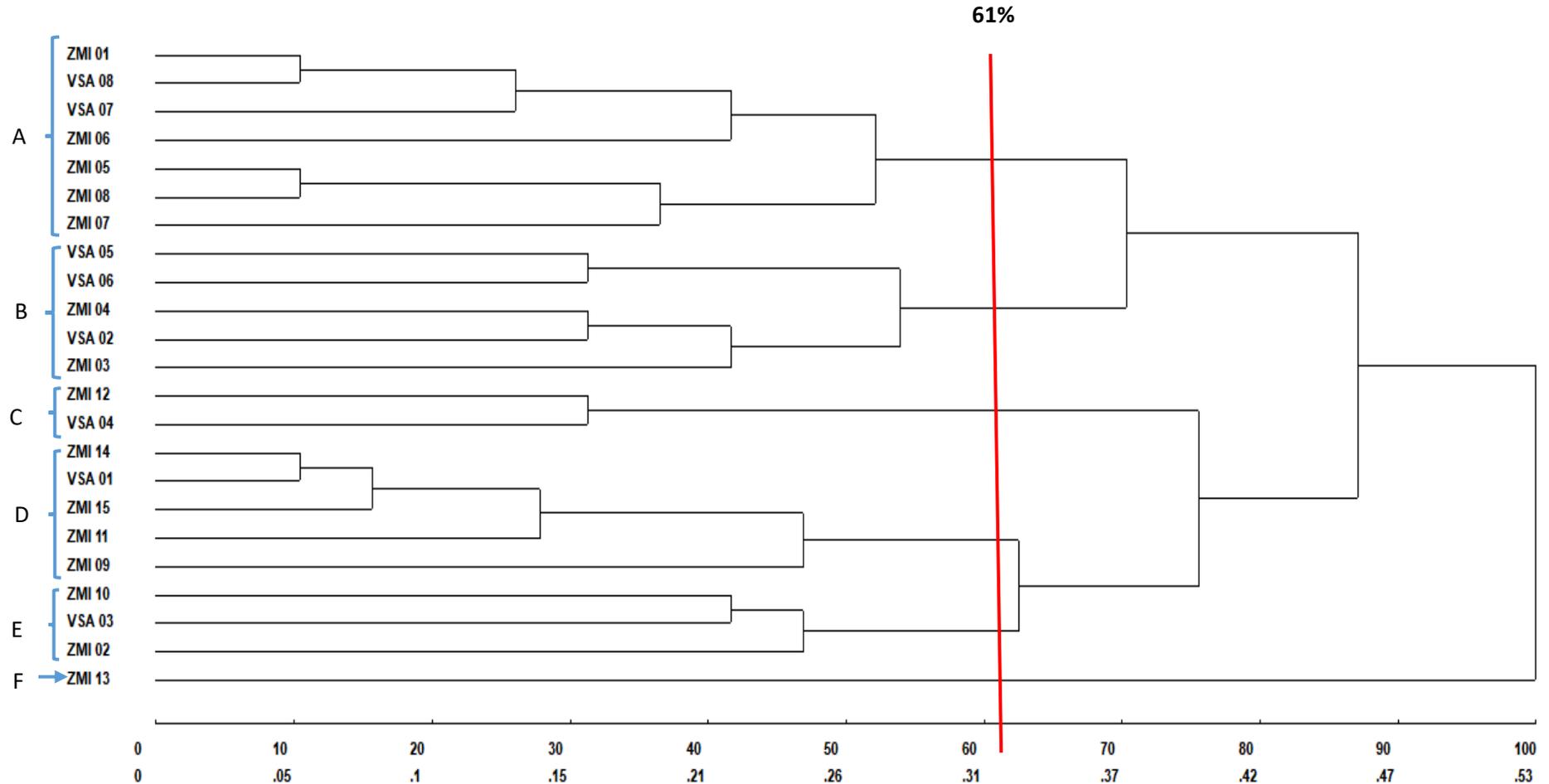
Comparando-se os métodos de Tocher e o UPGMA observou-se que ambos são eficientes na diferenciação da diversidade genética entre os isolados presentes dentro de nódulos de feijão-caupi coletados das três mesorregiões Pernambucanas. A partir desses métodos foi observado pouca variação na quantidade de grupos formados, onde o Tocher foi mais restritivo no Sertão Pernambucano, permitindo uma melhor distinção dos isolados e semelhante ao UPGMA nas mesorregiões do Agreste e Zona da Mata. As árvores filogenéticas mostraram uma diversidade genética entre os isolados de nódulos nativos presentes nas três mesorregiões, evidentes pelos diferentes grupos e subgrupos.



**Figura 5.** Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 37 isolados bacterianos associados ao Feijão-caupi cultivado em solos de quatro localidades (Moxóto de Ibimirim, Belém de São Francisco (Sertão de Itaparica), Central de Salgueiro, Araripe Araripina) da mesorregião do sertão Pernambucano. O coeficiente de Simple Matching foi utilizado para a construção da matriz de dissimilaridade com bootstrap de 1000 repetições. O estabelecimento dos grupos foi obtido considerando o nível de dissimilaridade de 69%.



**Figura 6.** Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 42 isolados bacterianos associados ao Feijão-caupi cultivado em solos de três localidades (Lajedo, Surubim e Caruaru) da mesorregião do Agreste Pernambucano. O coeficiente de Simple Matching foi utilizado para a construção da matriz de dissimilaridade com bootstrap de 1000 repetições. O estabelecimento dos grupos foi obtido considerando o nível de dissimilaridade de 67%.



**Figura 7.** Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 23 isolados bacterianos associados ao Feijão-caupi cultivado em solos de duas localidades ( Zona da Mata de Itapirema e Vitória de Santo Antão) da mesorregião da Zona da Mata Pernambucana. O coeficiente de Simple Matching foi utilizado para a construção da matriz de dissimilaridade com bootstrap de 1000 repetições. O estabelecimento dos grupos foi obtido considerando o nível de dissimilaridade de 61%.

#### 4.3.4 Caracterização molecular

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos 42 isolados selecionados a partir dos resultados bioquímicos resultou em 650 a 700 pb por amostra. Os isolados com número de sequências inferiores a 650 pb não foram incluídos para a construção da árvore filogenética. Todos os isolados em estudo, exibiram identidade acima de 99%, mostrando uma qualidade das amostras analisadas. Neste estudo foi observada a presença de nove gêneros bacterianos, distribuídos em três classes alfa proteobactérias, beta proteobactérias e gamma proteobactérias, sendo o gênero *Enterobacter* com maior número de representantes (50%), seguido de *Pseudomonas* (19%), *Pantoea* (9,5%), *Bacillus* (4,8%), *Brevibacillus* (4,8%), *Skermanella* (2,4%), *Brucella* (2,4%) e *Priestia* (4,8%) e *Rhizobium* (2,4%) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Identidade dos isolados nódulos de feijão-caupi, com base na sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blastn no GenBank.

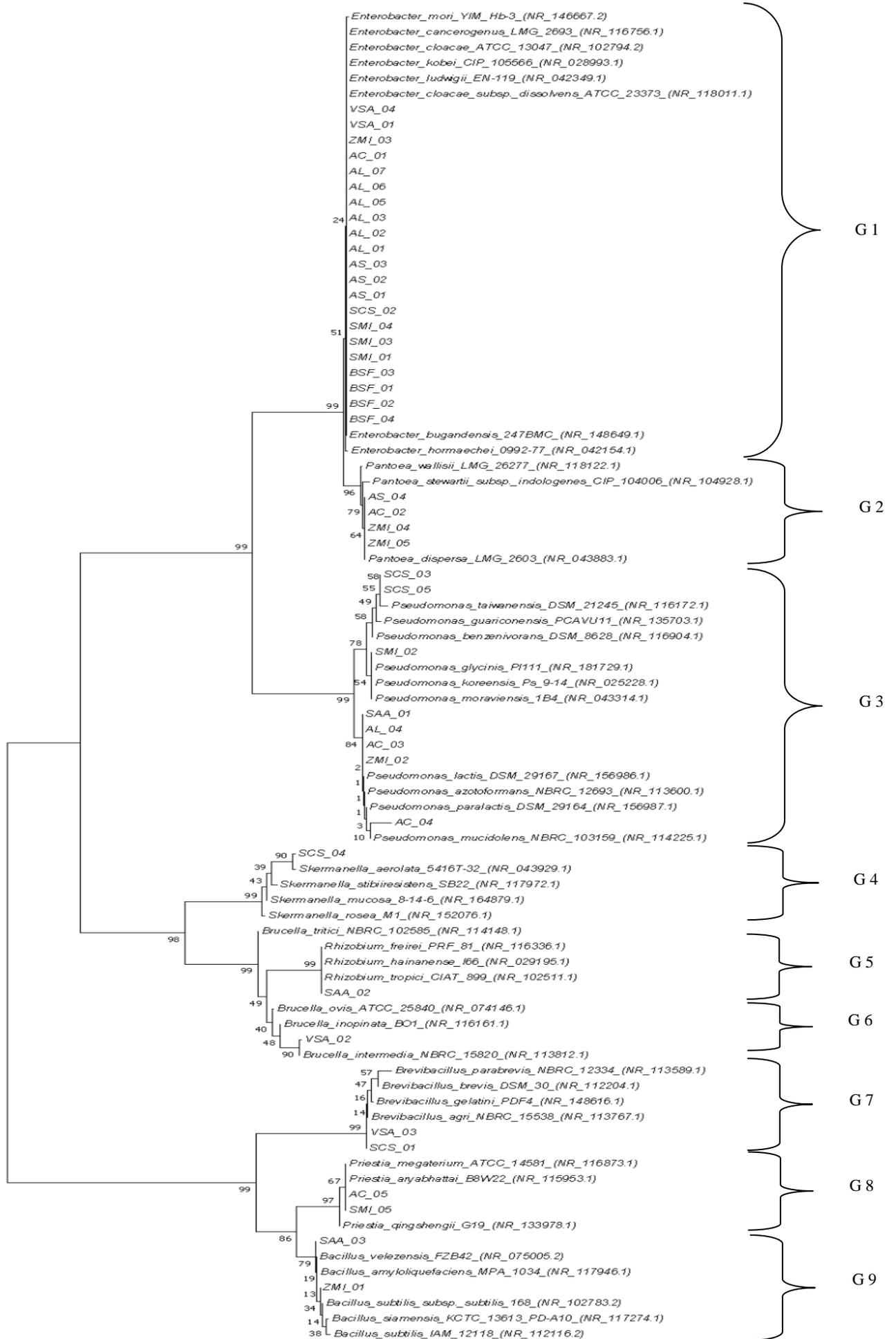
Isolado	Alinhamento significativo pelo Genbank	mais NCBI,	Nº Acesso (Cepa de Referência do GenBank)	de identidade (%)
BSF 01	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_148649.1	99,23
BSF 02	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_148649.1	99,11
BSF 03	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_148649.1	99,26
BSF 04	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_117679.1	99,71
SMI 01	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_146667.2	99,39
SMI 02	<i>Pseudomonas sp.</i>		NR_181729.1	99,85
SMI 03	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_118011.1	99,85
SMI 04	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_118011.1	99,85
SMI 05	<i>Priestia megaterium</i>		NR_116873.1	99,86
SAA 01	<i>Pseudomonas sp.</i>		NR_156986.1	100,00
SAA 02	<i>Rhizobium sp.</i>		NR_102511.1	100,00
SAA 03	<i>Bacillus sp.</i>		NR_117946.1	99,71
SCS 01	<i>Brevibacillus agri</i>		NR_113767.1	99,70
SCS 02	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_148649.1	99,55
SCS 03	<i>Pseudomonas sp.</i>		NR_116904.1	99,35
SCS 04	<i>Skermanella aerolata</i>		NR_043929.1	99,55
SCS 05	<i>Pseudomonas sp.</i>		NR_116904.1	99,12
AS 01	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_102794.2	99,70
AS 02	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_148649.1	99,70
AS 03	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_118011.1	99,71
AS 04	<i>Pantoea dispersa</i>		NR_116797.1	99,41
AL 01	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_148649.1	99,70
AL 02	<i>Enterobacter sp.</i>		NR_118011.1	99,71

AL 03	<i>Enterobacter sp.</i>	NR_118011.1	99,71
AL 04	<i>Pseudomonas sp.</i>	NR_156986.1	100,00
AL 05	<i>Enterobacter sp.</i>	NR_118011.1	99,70
AL 06	<i>Enterobacter sp.</i>	NR_117679.1	99,85
AL 07	<i>Enterobacter sp.</i>	NR_118011.1	99,85
AC 01	<i>Enterobacter sp.</i>	NR_146667.2	99,28
AC 02	<i>Pantoea dispersa</i>	NR_116797.1	99,42
AC 03	<i>Pseudomonas sp.</i>	NR_156986.1	100,00
AC 04	<i>Pseudomonas sp.</i>	NR_156986.1	96,30
AC 05	<i>Priestia megaterium</i>	NR_116873.1	100,00
ZMI 01	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_102783.2	99,86
ZMI 02	<i>Pseudomonas sp.</i>	NR_156986.1	100,00
ZMI 03	<i>Enterobacter sp.</i>	NR_028993.1	99,70
ZMI 04	<i>Pantoea dispersa</i>	NR_116797.1	99,55
ZMI 05	<i>Pantoea dispersa</i>	NR_116797.1	99,40
VSA 01	<i>Enterobacter sp.</i>	NR_146667.2	99,10
VSA 02	<i>Brucella intermedia</i>	NR_113812.1	99,85
VSA 03	<i>Brevibacillus agri</i>	NR_113767.1	99,71
VSA 04	<i>Enterobacter sp.</i>	NR_118011.1	99,41

A árvore filogenética construída com as sequências do gene 16S rRNA apresentou uma boa definição, dividindo-se em nove grupos principais (Figura 8). O primeiro grupo G1 pertence ao gênero *Enterobacter* e reúne o maior número de representantes num total de 21 isolados (VSA 04, VSA 01, ZMI 03, AC 01, AL 07, AL 06, AL 05, AL 03, AL 02, AL 01, AS 03, AS 02, AS 01, SCS 02, SMI 04, SMI 03, SMI 01, BSF 01, BSF 02, BSF 04) que estão associados com maior identidade com as estirpes de *Enterobacter sp.* O grupo G2, representado por bactérias do gênero *Pantoea*, apresentou quatro representantes (AS 04, AC 02, ZMI 04 e ZMI 05) com identidade de 99%, onde a percentagem de ligamento deu-se agrupando-se com *Pantoea dispersa* NR\_116797.1.

O grupo G3, contendo os isolados que tiveram agrupamento com as bactérias do gênero *Pseudomonas*, apresenta-se dividido em quatro subgrupos (Figura 8). O primeiro dele representado pelos isolados SCS 03 e SCS 05 constituiu uma associação com *Pseudomonas taiwanensis* NR\_116172.1. O segundo e o quarto subgrupos representados respectivamente por SMI 02 e AC 04 são considerados ramos monofiléticos, onde o segundo agrupa-se com *Pseudomonas moraviensis* NR\_043314.1, *P. glycinis* NR\_181729.1 e *P.koreensis* NR\_025228.1 e o quarto com *P.mucidolens* NR\_114225.1. O terceiro subgrupo representado pelos isolados SAA 01, AL 04, AC 03 e ZMI 02 se associaram com a espécie *P. lactis* NR\_156986.1 com identidade de 100%.

O grupo G4, G5, G6 e G9 formaram ramos monofiléticos, onde o G4 (SCS 04) teve agrupamento com bactérias do gênero *Skermanella*, com identidade de 99% com a espécie *S. aerolata* NR\_043929.1, o grupo G5 (SAA 02) com agrupamento de 100% com *Rhizobium sp* NR\_102511.1. O grupo G6 (VSA 02) agrupou-se com *Brucella intermedia* NR\_113812.1 e o G9 com bactérias do gênero *Bacillus*, onde neste ZMI 01 teve uma identidade de 99% com a espécie *B. subtilis* NR\_102783.2 e SAA 03 teve ligação com a espécie *B. amyloliquefaciens* NR\_117946.1. Os grupos G7 e G8, possuem dois representantes cada um, onde o G7 (VSA 03, SCS 01) estão agrupados com *Brevibacillus agri* NR\_113767.1 e o G8 (AC 05, SMI 05) associados ao gênero *Priestia*, sendo a espécie *P. megaterium* NR\_116873.1 e *P. aryabhatai* NR\_115953.1 com maior identidade entre os dois isolados deste grupo.



0.050

**Figura 8.** Árvore filogenética (gene rRNA 16S) dos isolados + linhagens de referência relacionadas (GenBank – obtidas pelo BLASTn), utilizando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de árvores em que os táxons associados se agruparam (análises Bootstrap com 1000 repetições) é mostrada nos ramos.

Dentre as três classes taxonômicas: Alfaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Bacilli observadas entre os isolados verificou-se uma maior associação destes com bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas* que pertencem a classe Gammaproteobacteria.

#### **4.3.5 Autenticação dos isolados para comprovar a habilidade de nodulação**

A autenticação dos isolados foi baseada na presença de pelo menos um nódulo nas raízes das plantas de feijão-caupi. Ela que tem por objetivo comprovar os resultados obtidos a partir da análise molecular demonstrou uma diferença dos resultados moleculares em relação ao experimento de autenticação. Foi observado que entre os isolados avaliados, VSA 01, VSA 03, ZMI 05, BSF 01, SAA 03, SMI 04, SCS 01, AS 03 foram capazes de nodular a planta hospedeira. Os demais isolados foram estabelecidos como endófitos não rizobianos. No grupo controle TA não foi observado nódulos nas plantas, dando indício de boa condução do experimento.

### **5.3 DISCUSSÃO**

Em relação as propriedades físicas-químicas a maior correlação das comunidades bacterianas nos solos de Mata com o Carbono orgânico se deve à alta fertilidade do Argissolo (JESUS *et al.*, 2019) que contribui com o aumento de nutrientes para os microrganismos (PERREIRA *et al.*, 2018). A presença elevada do alumínio  $Al^{+3}$  e o baixo pH como observado em SAA, ocasionam menor quantidade de nutrientes disponíveis, tais como P, N e K, interferindo na comunidade bacteriana (MENDES *et al.*, 2015) e inibindo o crescimento da raiz (RYAN e DELHAIZE, 2017).

#### **5.3.1 Características morfológicas e fisiológicas**

As propriedades físico-químicas do solo, a localização geográfica e o tipo de leguminosa moldam as características fenotípicas dos microrganismos a ela associados determinando sua diversidade e distribuição (MOHAMMED *et al.*, 2018, KOSKEY *et al.*, 2018). A influência das características do solo na diversidade de bactérias já foi observada

para rizóbios endófitos e não rizóbios de feijão-caupi na região semiárida brasileira (SENA *et al.*, 2020).

Medeiros *et al.*, (2009) ao avaliarem os isolados de nódulos de feijão-caupi em solos do estado do Rio Grande do Norte, verificaram colônias de coloração creme, borda inteira, circular e translúcida. Os resultados das análises dos isolados das três mesorregiões Pernambucanas analisadas evidenciam a diversidade morfológica entre as bactérias presentes em nódulos do feijão-caupi entre as regiões avaliadas, diversidade esta, também podendo ser explicada pelas características diferentes dos solos de origem (MANET *et al.*, 2016; RABIU, 2017).

Embora o feijão-caupi seja geralmente nodulado por rizóbios de crescimento lento pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* (ORMENO-ORRILLO e MARTINEZ- ROMERO, 2019), bactérias de crescimento rápido que tanto podem ser rizóbios quanto endofíticas também podem estar presentes nos nódulos dessa espécie (CHIDEBE *et al.*, 2018, KENASA *et al.*, 2018), corroborando com o que foi observado neste trabalho. O crescimento rápido de bactérias que nodulam leguminosas em regiões áridas e semiáridas como o Nordeste é uma estratégia de sobrevivência que permite que elas se multipliquem rapidamente num curto período de tempo (NYAGA e NJERU, 2020).

Em relação a produção de ácido e álcalis, a predominância de isolados com reação ácida nas três mesorregiões corrobora com as características de bactérias de crescimento rápido (SANKHLA *et al.*, 2015). A produção de muco é uma característica importante no processo de infecção inicial das raízes. Quanto maior a sua produção, mais vantagem terá essa bactéria na competição da infecção inicial das raízes, colonização e formação dos nódulos (SANTOS *et al.*, 2011). A baixa produção de muco observada entre os isolados das mesorregiões analisadas, principalmente Sertão e Zona da Mata pode representar uma desvantagem para essas bactérias infectarem as raízes, pois o muco atua na colonização e formação de nódulos.

A produção de muco é uma característica importante no processo inicial de infecção das raízes onde, segundo Santos *et al.*, (2011), isolados com capacidade de produzir muco possuem vantagem competitiva na infecção inicial das raízes, colonização e formação de nódulos. Além disso, as bactérias ficam menos resistentes a microrganismos produtores de antibióticos, pois é a produção de muco que ocasiona a alteração da permeabilidade das células (MEDEIROS *et al.*, 2009).

Segundo Pervin *et al.*, (2017), características morfofisiológicas geralmente estáveis como forma, tamanho, consistência, tempo de crescimento, alteração de pH são úteis na

definição de estirpes. A similaridade de resultados quanto as características morfofisiológicas encontradas nos maiores grupos verificados em cada mesorregião analisada confirmam uma possível semelhança dos tipos de isolados encontrados em cada região. Além disso, confirma que as condições edafoclimáticas exercem influência no processo de simbiose entre as bactérias e as leguminosas e quanto a sua capacidade de se adaptar ao meio onde habitam (MOURA *et al.*, 2020).

### 5.3.3 Características bioquímicas

A baixa reatividade dos isolados em relação a maioria das enzimas avaliadas demonstram que os isolados nativos de cada uma dessas mesorregiões podem exibir dificuldade na promoção do crescimento vegetal através desses processos bioquímicos. Em relação a urease, a sua baixa produção é um indicativo que a quantidade disponível de nitrogênio para os vegetais é pequena, havendo a necessidade da utilização dos consórcios com outras bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> como requisito para a sobrevivência (CHIBEBA *et al.*, 2020).

A baixa produção de amilase, protease e lipase, que são enzimas que atuam indiretamente no crescimento vegetal a partir da supressão de patógenos (REDDY, 2013), demonstram que o feijão-caupi, cultivado nestas regiões, poderá estar mais suscetível a ação de fitopatógenos, comprometendo assim sua produtividade. As condições do solo podem ter influenciado nos resultados desse trabalho. Além disso, como protease e amilase junto com urease e gelatinase participam da formação dos nódulos e consequente processo de fixação biológica de nitrogênio (KUMARI *et al.*, 2010), esses processos podem ser comprometidos.

Assim como a maioria das outras enzimas avaliadas a baixa produção de celulase observada nas três mesorregiões pernambucanas também interfere na promoção do crescimento vegetal, uma vez que ela participa ativamente do processo simbiótico entre bactérias e leguminosas. A celulase atua na infecção bacteriana nas raízes e na liberação das bactérias dentro do nódulo do hospedeiro (MARTINEZ-HIDALGO e HIRSCH, 2017). Os rizóbios noduladores por exemplo são capazes de produzir celulase em algum momento da sua atividade metabólica (NUNES *et al.*, 2018).

Uma forma de fazer a diferenciação dos microrganismos é através da hidrólise da gelatinase onde ela pode ser utilizada para determinar a patogenicidade a partir da sua capacidade de quebrar o colágeno e se espalhar pelo organismo hospedeiro (PILLAY *et*

*al.*, 2018). As espécies reativas de oxigênio são um metabólito vegetal produzido sob condições de crescimento normal e de estresse biótico e abiótico. Enzimas como a catalase estão envolvidas no metabolismo de ROS e no processo de defesa das células vegetais. A expressão da catalase é induzida por estímulos de estresse ambiental e patógenos (SINGH *et al.*, 2021).

O fósforo é o segundo macronutriente mais limitante necessário para o crescimento vegetal depois do nitrogênio, onde existe uma demanda relativamente alta de fósforo nos nódulos de leguminosas fixadoras de N<sub>2</sub>. A disponibilidade de fósforo controla o crescimento e desenvolvimento de todas as culturas (WYNGAARD *et al.*, 2016). Bactérias solubilizadoras de fosfato convertem o fósforo insolúvel que está indisponível para a planta em solúvel (ZAIDI *et al.*, 2017). A solubilização do fosfato de cálcio tem sido considerada uma característica importante que as bactérias apresentam para promover o crescimento da planta, uma vez que sob baixa disponibilidade de P, os nódulos diminuiriam em grande parte a utilização do nitrogênio atmosférico (SÁNCHEZ-CRUZ *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2018).

Como as condições adversas da região semiárida podem inibir a sobrevivência das bactérias nesses solos, devido a temperaturas altas, baixa umidade do solo e baixo teor de matéria orgânica, a produção de catalase, gelatinase e solubilização de fosfato representam características ecológicas vantajosas de sobrevivência para as bactérias em solos com baixo teor de carbono e fósforo (CHIBEBA *et al.*, 2020).

A auxina é o principal hormônio produzido nas plantas, onde ela controla muitos processos fisiológicos importantes, incluindo aumento e divisão celular, diferenciação de tecidos, respostas à luz (JI *et al.*, 2014), melhora o número de raízes adventícias, o que resulta em aumento da absorção de nutrientes (BABAR *et al.*, 2021) e água, estimulando assim o seu crescimento (KUMARI *et al.*, 2018). A produção de AIA (ácido indol 3-acético) é uma ferramenta eficaz na seleção de microrganismos benéficos na promoção de crescimento das plantas (WAHYUDI *et al.*, 2011).

A diferença entre a quantidade de testes positivos observados entre os isolados das três mesorregiões analisadas pode ser um parâmetro a ser empregado na seleção de estirpes bacterianas eficientes no processo de nodulação e promoção de crescimento do feijão-caupi. Além disso, esses isolados podem ser utilizados como potenciais inoculantes nas práticas agrícolas, uma vez que atuam como biofertilizantes e estimuladores da tolerância às condições de estresse (GLICK, 2012).

De um modo geral as análises morfológicas, fisiológicas e bioquímicas é um passo inicial para a identificação da similaridade entre os grupos de bactérias estudadas nas três mesorregiões Pernambucanas e a diversidade de isolados. A partir das análises dos testes de agrupamento pelo método de Tocher e UPGMA observou-se que os isolados da região do Agreste exibiram um maior número de grupos monofiléticos em relação as demais regiões analisadas o que representa uma maior diversidade genética.

A diminuição da diversidade genética verificada na mesorregião do Sertão é devido a presença de duplicadas e triplicatas indicando que determinados isolados possuem características semelhantes. Além disso permitem uma melhor compreensão do papel que eles exercem na promoção de crescimento das plantas (CORDEIRO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

#### 5.3.4 Caracterização molecular

As análises moleculares baseadas em baseadas no sequenciamento parcial do 16S rRNA amplificados mostraram uma variação genética altamente significativa de isolados não rizobianos nas três mesorregiões Pernambucanas em relação aos rizóbios. A ausência do gênero *Bradyrhizobium* em nódulos de feijão-caupi, considerado o principal simbiote dessa leguminosa, como observado neste trabalho, se deve ao fato de que cepas de *Bradyrhizobium* sofrem influência das condições climáticas em regiões áridas e semi-áridas podendo ocasionar a diminuição da sua abundância e diversidade (SENA *et al.*, 2020; MUINDI *et al.*, 2021).

Bactérias do gênero *Rhizobium* são encontradas em nódulos do feijão-caupi (ROCHA *et al.*, 2020; MUINDI *et al.*, 2021; AMORIM *et al.*, 2022) assim como foi observada neste trabalho. Essas bactérias estimulam o crescimento vegetal através da supressão de doenças através da produção de sideróforos (KHAN *et al.*, 2018), produção de fitormônios (VELAZQUEZ *et al.*, 2017), fixação de nitrogênio (ANDREWS E ANDREWS, 2017), tolerância aos estresses abióticos (RAMIREZ *et al.*, 2020; ODORI *et al.*, 2020) e solubilização de fosfato (RODRIGUES *et al.*, 2018; FLORES-FÉLIX *et al.*, 2020).

Fato interessante observado neste estudo, é que dentre os oito gêneros encontrados, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Skermanella*, *Brucella*, *Brevibacillus*, *Priestia* e *Bacillus*, distribuídos entre as classes Alphaproteobacterias, Gamaproteobacterias e Bacillis nenhum deles até o momento são descritos como noduladores de feijão-caupi (COSTA *et*

*al.*, 2013; MUINDI *et al.*, 2021). Todos esses gêneros são considerados endofíticos não noduladores, podendo ter capacidade promotoras de crescimento (COSTA *et al.*, 2016; NAVEED *et al.*, 2014; LEITE *et al.*, 2017).

Estudos demonstram que as bactérias não rizobianas são altamente diversas e abundantes nos nódulos das culturas de leguminosas (MARTÍNEZ-HIDALGO E HIRSCH, 2017, NOORI *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2020). Mayhood e Mirza, (2021); Sharaf *et al.*, (2019) e Wigley *et al.*, (2017) relataram abundância de bactérias não rizobianas em nódulos radiculares na porcentagem de <0,1%, ~40% e <3%, respectivamente. Os isolados do gênero *Enterobacter*, são comumente achados em nódulos de leguminosas, podendo estar coabitando com outras espécies bacterianas. Este gênero já foi encontrado em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e outros feijões como promotores de crescimento (KAWAKA *et al.*, 2018; SHAMMER e PRASAD, 2017). Espécies de *Enterobacter* já foram relatadas como tendo capacidade de infecção e genes de nodulação (DENG *et al.*, 2020).

*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* atuam na promoção do crescimento vegetal através a tolerância a estresses abióticos como seca e salinidade (COSTA *et al.*, 2013; ILYAS *et al.*, 2020, SAGAR *et al.*, 2020) produção de sideróforos (COSTA *et al.*, 2016; VERMA *et al.*, 2019 a; VERMA *et al.*, 2019 b) e fitorhormônios (KHAN *et al.*, 2016) e solubilização de fosfato de cálcio (MAGIOGLIO *et al.*, 2022). Cepas de *Bacillus* foram obtidas de nódulos radiculares de plantas de feijão-caupi cultivadas em solos do semiárido brasileiro (COSTA *et al.*, 2013 ) e cepas de *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Bacillus* foram isoladas de nódulos de feijão-caupi (JARAMILLO *et al.*, 2013; OLIVEIRA-LONGATTI *et al.*, 2014) na região amazônica.

Da Silva *et al.*, (2021) demonstrou que *Pseudomonas* atua no combate de agentes patogênicos (*Fusarium* e *Macrophomina*) aumentando a germinação e emergência do feijão-caupi. Além disso, proporcionou ganhos no peso seco da parte aérea e da semente de *Vicia faba* (SAIDI *et al.*, 2013) e junto com *Pantoea* promoveu crescimento em Tremoço (*Lupinus luteus* e *Lupinus angustifolius*) (FERCHICHI *et al.*, 2019). *Pantoea* já foi encontrado em nódulos de amendoim onde atuaram no aumento da sua biomassa (TAURIAN *et al.*, 2010) e em nódulos de Alfafa proporcionando resistência a estresses abióticos (NOORI *et al.*, 2021). *Priestia* e *Brucella* foram encontrados em raiz de grão de bico atuando no combate de fitopatógenos (KANNA *et al.*, 2022).

A presença dessa variedade de bactérias endofíticas dentro dos nódulos de feijão-caupi confirmam os estudos de Zgadzaj *et al.*, (2015) que utilizando *Mesorhizobium loti*

inoculado em *Lotus japonicus* relataram que o processo de infecção gerado pelo simbiote, direciona seletivamente as bactérias endofíticas até o nódulo primordial, onde, em caso de compatibilidade, se multiplicam. Essa infecção pode ser considerada algo negativo do ponto de vista econômico, uma vez que as bactérias endofíticas competem por espaço nos nódulos com as simbiontes, podendo diminuir a eficiência da fixação de nitrogênio e afetar negativamente o crescimento da planta (TERPOLILLI *et al.*, 2012).

No entanto, há poucas informações sobre o papel dessas bactérias endofíticas nos nódulos de leguminosas, sendo que podem ser importantes ecológica e evolutivamente, especialmente quando presentes em plantas pioneiras localizadas em solos pobres quanto à presença de bactérias fixadoras de nitrogênio (ZGADZAJ *et al.*, 2015). Além disso, mesmo que estas bactérias não fixem nitrogênio, mas uma vez possuam outras características que as classifiquem como Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCPs), elas podem trazer diversos benefícios à hospedeira. É o caso, por exemplo, dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus* (SHAMEER e PRASAD, 2017) e *Pseudomonas* (SHAIENDRA SINGH, 2015; ROYCHOWDHURY *et al.*, 2019; FAN e SMITH, 2021).

Diante do observado nesse trabalho verifica-se que o estudo dos isolados deve ser realizado por mais de um método, visto que alguns táxons dominantes não podem ser estudados por uma abordagem tradicional (CHIDEBE *et al.*, 2018). A taxonomia polifásica deve ser aplicada a estes microrganismos permitindo a melhor compreensão das mudanças dinâmicas durante o processo de isolamento em planta, diferenciar os locais de coleta, visto que novos genes poderiam ajudar na conclusão de uma filogenia molecular segura (COSTA *et al.*, 2018, DA COSTA *et al.*, 2017).

### **5.3.5 Autenticação de isolados do feijão-caupi**

A diferença entre os resultados moleculares e a autenticação dos isolados demonstram que estes podem ter sido submetidos a estresse abiótico tais como temperatura, que tem grande efeito sobre o crescimento dos rizóbios (SINGH *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2014; TENA *et al.*, 2017) e com isso favoreceu o crescimento de bactérias não rizóbias que são mais tolerantes a altas temperatura de incubação (BODHANKAR *et al.*, 2017; VO *et al.*, 2021)

Além disso, como as bactérias isoladas eram predominantemente de crescimento rápido e acidificantes, características estas que estão presentes em bactérias endofíticas, estas podem ter crescido mais rápido que os rizóbios durante o processo de isolamento (LI *et al.*, 2008). Vale destacar ainda que as bactérias não rizóbias podem ter gerado

antibióticos que inibiram o crescimento de rizóbios durante o isolamento (ETESAMI, 2022). A presença de isolados endófitos nos nódulos comprova a compatibilidade dessas bactérias com a planta hospedeira e que cada um ocupa um nicho ecológico diferente no nódulo radicular coexistindo com os rizóbios (DE MEYER *et al.*, 2015; MUINDI *et al.*, 2021).

## 6. CONCLUSÃO

As análises morfofisiológicas e bioquímicas foram eficientes na diferenciação dos isolados presentes em nódulos do feijão-caupi encontrados em solos das mesorregiões do Sertão, Agreste e Zona da Mata de Pernambuco.

Os isolados SMI 02, SMI 09, BSF 05, SAA 04 e SAA 05 no sertão, AL 02, AC 02, AC 05, AC 09, AS 02 e AS 10 no Agreste, ZMI 02, ZMI 09, ZMI 10, ZMI 11, VSA 01 e VSA 04 na Zona da Mata possuem o maior número de caracteres bioquímicos que os classificam como promotores de crescimento em feijão-caupi.

Nódulos de feijão-caupi são colonizados por bactéria dos gêneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Skermanella*, *Brucella*, *Rhizobium*, *Brevibacillus* e *Priestia* que caracterizam-se como potenciais promotores de crescimento.

As bactérias não noduladoras que foram efetuadas caracterização taxonômica é um recurso de ação sinérgica com os rizóbios para o aumento de novos inoculantes microbianos mais eficientes para a cultura do feijão-caupi.

Os solos da mesorregião do Agreste possuem maior riqueza e diversidade de isolados em relação aos das mesorregiões do Sertão e Zona da Mata.

## 7. REFERÊNCIAS

- Adediran, O. A., Osunde, A. O., Bala, A., Dianda, M., Ibrahim, H., & Oladiran, J. A. **Symbiotic effectiveness of brazilian rhizobial strains in improving n-fixation and productivity of cowpea in minna, southern guinea savanna of Nigeria.** 2019.
- Ahemad, M.; Kibret, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King saud University-science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- Almeida, A.M.M.; Mendes Filho, P.F.; Garcia, K.G V.; Gomes, V.F.F.; Almeida, C.L. Densidade, caracterização e eficiência de bactérias fixadoras de Nitrogênio em áreas de

- caatinga degradada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 1, p. 16-21, 2018.
- Amorim, M. R., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., De Souza Oliveira, L. M., MELO, V. M. M., Oliveira, F. A. S., Aquino, J.P.A; Rocha, S. M Barbosa; Pereira, A. P. A, Costa, A. F.; Oliveira, J. P.; Araújo, , F.F., Figueiredo, M.V, B., Araujo, A. S. F. Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. **Applied Soil Ecology**, v. 172, p. 104354, 2022.
- Andrews, M.; Andrews, M. E. Specificity in legume-rhizobia symbioses. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 705, 2017.
- Azevedo, T.M., Aburjaile, F. F., Ferreira-Neto, J. R. C., Pandolfi, V., & Benko-Iseppon, A. M. The endophytome (plant-associated microbiome): methodological approaches, biological aspects, and biotech applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1-25, 2021
- Babar, M., Rasul, S., Aslam, K., Abbas, R., Manzoor, I., Hanif, M. K., & Naqqash, T. Mining of halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria and their impact on wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. **Journal of King Saud University-Science**, v. 33, n. 3, p. 101372, 2021.
- Beghalem, H., Aliliche, K., Chriki, A., & Landoulsi, A. Molecular and phenotypic characterization of endophytic bacteria isolated from sulla nodules. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 225-231, 2017.
- Bodhankar, S., Grover, M., Hemanth, S., Reddy, G., Rasul, S., Yadav, SK, ... & Srinivasarao, C. Maize seed endophytic bacteria: dominance of antagonistic, lytic enzyme-producing *Bacillus* spp. **3 Biotech**, v. 7, n. 4, p. 1-13, 2017.
- Chibeba, A. M., Pereira, C. S., Antunes, J. E. L., Ribeiro, R. A., de Almeida Lopes, A. C., Gomes, R. L. F. & Araujo, A. S.F. Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. **Symbiosis**, v. 80, n. 3, p. 279-292, 2020.
- Chidebe, I. N.; Jaiswal, S. K.; Dakora, F. D. Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) nodulation in three agroecological regions of Mozambique. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 2, p. e01712-17, 2018
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 125, 2018.

- Cordero, I., Ruiz-Díez, B., De La Peña, T. C., Balaguer, L., Lucas, M. M., Rincón, A., Pueyo, J. J. Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of *Vachellia macracantha*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 96, p. 39-54, 2016.
- Costa, M. R., Chibeba, A. M., Mercante, F. M., & Hungria, M. Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean [*Phaseolus vulgaris* (L.)] isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity. **Symbiosis**, v. 76, n. 2, p. 163-176, 2018.
- Costa, E. M., Nóbrega, R. S. A., Carvalho, F., Trochmann, A., Ferreira, L. V. M., and Moreira, F. M. S. Plant growth promotion and genetic diversity of bacteria isolated from cowpea nodules. **Pesq. Agropec. Bras.** 48, 1275–1284, 2013.
- Costa, E.M.D, Carvalho, F.D, Nóbrega, R.S.A, Silva, J.S, Moreira, F.M.D.S. Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. **Scientia Agricola**, v. 73, p. 301-310, 2016.
- Custódio, V., Gonin, M., Stabl, G., Bakhoun, N., Oliveira, M. M., Gutjahr, C., & Castrillo, G. Sculpting the soil microbiota. **The Plant Journal**, v. 109, n. 3, p. 508-522, 2022.
- Da Costa, A.F, Silva do Vale, L., de Oliveira, A.B., de Brito Neto, J.F., Souto Ribeiro, W., Cardoso, G.D. Evaluation of yield performance in cowpea genotypes ('*Vigna unguiculata*'(L.) Walp.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 3, p. 308-312, 2017.
- Da-Silva, J. R., Alexandre, A., Brígido, C., & Oliveira, S. Can stress response genes be used to improve the symbiotic performance of rhizobia?. **AIMS microbiology**, v. 3, n. 3, p. 365, 2017.
- Da Silva, V. B., Bomfim, C. S. G., Sena, P. T. S., Santos, J. C. S., Mattos, W. D. S., Gava, C. A. T. & Fernandes-Júnior, P. I. *Vigna* spp. Root-Nodules Harbor Potentially Pathogenic Fungi Controlled By Co-habiting Bacteria. **Current Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1835-1845, 2021.
- De Meyer, SE, De Beuf, K., Vekeman, B., & Willems, A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 1-11, 2015.
- Dees, C., Ringelberg, Scott, T.C., Phelps, T.J. Characterization of the Cellulose-Degrading Bacterium NCIMB 10462. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.51-52, p. 263-274, 1995.
- Deng, Z. S., Zhao, L. F., Kong, Z. Y., Yang, W. Q., Lindström, K., Wang, E. T., & Wei, G. H. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in

- different regions of Loess Plateau in China. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 3, p. 463-475, 2011.
- Deng, Z. S., Kong, Z. Y., Zhang, B. C., & Zhao, L. F. Insights into non-symbiotic plant growth promotion bacteria associated with nodules of *Sphaerophysa salsula* growing in northwestern China. **Archives of microbiology**, v. 202, n. 2, p. 399-409, 2020.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, DF, **Embrapa Informação Tecnológica**, 627 p., 2009.
- Etesami, H. Root nodules of legumes: a suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. **Current Research in Biotechnology**, 2022.
- Fan, D., & Smith, D. L. Characterization of Selected Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Their Non-Host Growth Promotion Effects. **Microbiology spectrum**, v. 9, n. 1, p. e00279-21, 2021.
- Ferchichi, N., Toukabri, W., Boularess, M., Smaoui, A., Mhamdi, R., & Trabelsi, D. Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 10, p. 1333-1349, 2019.
- Flores-Félix, J. D., Carro, L., Cerda-Castillo, E., Squartini, A., Rivas, R., & Velázquez, E. Analysis of the interaction between *Pisum sativum* L. and *Rhizobium laguerreae* strains nodulating this Legume in Northwest Spain. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1755, 2020.
- Glick, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1538, 2016.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. **The water culture method of growing plants without soil**. University of California, Berkeley, 1. ed, 32p. 1950.
- Hungria, M.; Araujo, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Centro Nacional de Soja. Brasília: EMBRAPA-SPI, (EMBRAPA-CNPAP, Documentos, 46). 542p. 1994.
- Ibny, F. Y., Jaiswal, S. K., Mohammed, M., & Dakora, F. D. Symbiotic effectiveness and ecologically adaptive traits of native rhizobial symbionts of Bambara groundnut (*Vigna*

- subterranea* L. Verdc.) in Africa and their relationship with phylogeny. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2019.
- Idris, A. O. A.; Noh, E. A. G. **Legumes and Nodule Associated Bacteria Interaction as Key Factor for Abiotic Stresses Impact Mitigation**. 2021.
- Ilyas, N., Mazhar, R., Yasmin, H., Khan, W., Iqbal, S., Enshasy, H. E., & Dailin, D. J. Rhizobacteria isolated from saline soil induce systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) against salinity stress. **Agronomy**, v. 10, n. 7, p. 989, 2020.
- Jaramillo, P. M. D., Guimarães, A. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., Nóbrega, R. S. A., and Moreira, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, v. 70, p. 397-404, 2013.
- Jesus, K. N., Albuquerque, E. R. G. M., Sales, A. T., Sampaio, E. V. D. S. B. Estoques de carbono em solos de Pernambuco, Brasil (Carbon stocks in soil of Pernambuco state, Brazil). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 12, n. 3, p. 714-721, 2019.
- Ji, S. H., Gururani, M. A., & Chun, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 83-98, 2014.
- Jiménez-Mejía, R., Medina-Estrada, R. I., Carballar-Hernández, S., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Santoyo, G., & Loeza-Lara, P. D. Teamwork to Survive in Hostile Soils: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria to Ameliorate Soil Salinity Stress in Crops. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 150, 2022.
- Johnson, G. H. Throughput DNA extraction of legume root nodules for rhizobial metagenomics. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2019.
- Kawaka, F., Makonde, H., Dida, M., Opala, P., Ombori, O., Maingi, J., & Muoma, J. Genetic diversity of symbiotic bacteria nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. e0207403, 2018.
- Kenasa, G., Assefa, F., & Habteselassie, M. Y. Phenotypic and genotypic characteristics of cowpea rhizobia from soils of Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 42, p. 1299-1312, 2018.
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., ... & Hirsch, A. M. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2363, 2018.

- Khan, M. M. A., Khatun, A., & Islam, M. T. Promotion of plant growth by phytohormone producing bacteria. **Microbes in Action; Nova Science Publishers: New York, NY, USA**, p. 1-43, 2016.
- Khanna, A., Raj, K., Kumar, P., & Wati, L. Antagonistic and growth-promoting potential of multifarious bacterial endophytes against *Fusarium* wilt of chickpea. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, p. 1-9, 2022.
- Koskey, G.; Mburu, S.W.; Kimiti, J.M.; Ombori, O.; Maingi, J.M.; Njeru, E. M. Genetic characterization and diversity of *Rhizobium* isolated from root nodules of mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 968, 2018.
- Kumari, B. S., Ram, M. R., & Mallaiah, K. V. Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profiles of *Rhizobium* isolated from Indigofera species. **Malay J Microbiol**, v. 6, p. 133-139, 2010.
- Kumari, P., Meena, M., Upadhyay, R. S. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 155-162, 2018.
- Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons, p.115-175. 1991.
- Leite, J., Fischer, D., Rouws, L. F., Fernandes-Júnior, P. I., Hofmann, A., Kublik, S., Schloter, M., Xavier, G. R., Radl, V. Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2064, 2017.
- Li, J. H., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238-246, 2008.
- Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N., and Wang, E. Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 8, p. 632-648, 2018.
- Lopes, L.S., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., De Souza Oliveira, L. M., Melo, V. M. M., De Araujo Pereira, A. P., Costa, A. F., Oliveira, J.P., Martínez, C. R., Figueiredo, M. V.B., Araujo, A. S. F. Distinct bacterial community structure and composition along different cowpea producing ecoregions in Northeastern Brazil. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

- Malgioglio, G., Rizzo, G. F., Nigro, S., Lefebvre du Prey, V., Herforth-Rahmé, J., Catara, V., e Branca, F. Plant-Microbe Interaction in Sustainable Agriculture: The Factors That May Influence the Efficacy of PGPM Application. **Sustainability**, v. 14, n. 4, p. 2253, 2022.
- Manet, L., Boyomo, O., Begoude, A. D. B., e Sarr, P. S. Diversity and dynamics of rhizobial populations in acidic soils with aluminum and manganese toxicities in forest zones. **International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology (IJARIT)**, v. 6, n. 2355-2020-1607, p. 12-23, 2016.
- Martínez-Hidalgo, P., Hirsch, A. M. The nodule microbiome: N<sub>2</sub>-fixing rhizobia do not live alone. **Phytobiomes**, v. 1, n. 2, p. 70-82, 2017.
- Martins, L.M.V. Xavier, G. R., Neves, M. C. P., e Rumjanek, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”**. EMBRAPA: Comunicado Técnico 19. 14 p, 1997.
- Mayhood, P; Mirza, B.S. Soybean root nodule and rhizosphere microbiome: distribution of rhizobial and nonrhizobial endophytes. **Applied and environmental microbiology**, v. 87, n. 10, p. e02884-20, 2021.
- Medeiros, E.V.; Martins, C.M.; Lima, J.A.M.; Fernandes, Y.T.D.; Oliveira, V.R.; Borges, W.L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.
- Melloni, R., Moreira, F. M. D. S., Nóbrega, R. S. A., & Siqueira, J. O. D. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata*(L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.235-246, 2006.
- Mendes, L. W., de Lima Brossi, M. J., Kuramae, E. E., e Tsai, S. M. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151-160, 2015.
- Mohammed, M., Jaiswal, S. K., e Dakora, F. D. Distribution and correlation between phylogeny and functional traits of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.)-nodulating microsymbionts from Ghana and South Africa. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2018.
- Moura, E.G, Carvalho, C.S, Bucher, C.P, Souza, J.L, Aguiar, A.C, Ferraz Junior, A.S,Bucher, C.A., Coelho, K.P. Diversity of rhizobia and importance of their interactions with legume trees for feasibility and sustainability of the tropical agrosystems. **Diversity**, v. 12, n. 5, p. 206, 2020.

- Muindi, M.M, Muthini, M., Njeru, E.M, Maingi, J. Symbiotic efficiency and genetic characterization of rhizobia and non rhizobial endophytes associated with cowpea grown in semi-arid tropics of Kenya. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. e06867, 2021.
- Nautiyal, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.
- Naveed, M.; Mitter, B.; Yousaf, S.; Pastar, M.; Afzal, M.; Sessitsch, A. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 2, p. 249-262, 2014.
- Noori, F., Etesami, H., Noori, S., Forouzan, E., Salehi Jouzani, G., Malboobi, M.A., 2021. Whole genome sequence of *Pantoea agglomerans* ANP8, a salinity and drought stress-resistant bacterium isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) root nodules. **Biotechnology Reports**, v. 29, p. e00600, 2021.
- Noori, F., Etesami, H., Zarini, H. N., Khoshkholgh-Sima, N. A., Salekdeh, G. H., & Alishahi, F. Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 162, p. 129-138, 2018.
- Nunes, G. D. O., Menezes, K. A. S., Sampaio, A. A., Leite, J., Fernandes Junior, P. I., Seido, S., Zilli, J. E., Martins, L. M. V. Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 612-624, 2018.
- Nyaga, J. W., e Njeru, E. M. Potential of native rhizobia to improve cowpea growth and production in semi-arid regions of Kenya. **Frontiers in Agronomy**, v. 2, p. 28, 2020.
- Odori, C., Ngaira, J., Kinyua, J., e Nyaboga, E. N. Morphological, genetic diversity and symbiotic functioning of rhizobia isolates nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in soils of Western Kenya and their tolerance to abiotic stress. **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1853009, 2020.
- Oliveira, J.T.C.; Silva, G.T.; Diniz, W.P.S.; Figueredo, E.F.; Santos, I. B.; Lima, D.R.M.; Quecine, M.C.; Sobral, J.K.; Freire, F.J. Diazotrophic bacteria isolated from *Brachiaria spp.*: genetic and physiological diversity. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 45, n. 3, p. 277-289, 2018.
- Oliveira-Longatti, S. M., Marra, L. M., Soares, B. L., Bomfeti, C. A., Da Silva, K., Ferreira, P. A. A. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from

- rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1239-1250, 2014.
- Ormeño-Orrillo, E.; Martínez-Romero, E. A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium* genus. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1334, 2019.
- Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., e Uhlik, O. The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. **Biotechnology advances**, v. 44, p. 107614, 2020.
- Patil, A., Kale, A., Ajane, G., Sheikh, R., e Patil, S. Plant growth-promoting *Rhizobium*: mechanisms and biotechnological prospective. In: *Rhizobium* biology and biotechnology. **Springer**, Cham, p. 105-134. 2017.
- Pereira, A. P., Zagatto, M. R., Brandani, C. B., Mescolotti, D. D. L., Cotta, S. R., Goncalves, J. L., e Cardoso, E. J. *Acacia* changes microbial indicators and increases C and N in soil organic fractions in intercropped *eucalyptus* plantations. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 655, p. 1-13, 2018.
- Pervin, S.; Jannat, B.; A.L. Sanjee, S. Characterization of Rhizobia from Root Nodule and Rhizosphere of *Lablab purpureus* and *Vigna sinensis* in Bangladesh. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 14-17, 2017.
- Pillay, S., Zishiri, O. T., Adeleke, M. A. Prevalence of virulence genes in Enterococcus species isolated from companion animals and livestock. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 85, n. 1, p. 1-8, 2018.
- Pinheiro, M., Sousa, J., Bertini, C., Martins, S. C., e Martins, C. Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.
- Rabiu, H. M. Phenotypic and Temperature Tolerance Variations in Bacterial Endophytes Isolated from Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Nodules Recovered from Smallholder Farms in Northern Nigeria. **Journal of Dryland Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 70-84, 2017.
- Ramírez, M. D. A., España, M., Lewandowska, S., Yuan, K., Okazaki, S., Ohkama-Ohtsu, N., e Yokoyama, T. Phylogenetic analysis of symbiotic bacteria associated with two *Vigna* species under different agro-ecological conditions in Venezuela. **Microbes and environments**, v. 35, n. 1, p. ME19120, 2020.
- Reddy, P.P. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Recent advances in crop protection. **Springer**, India, pp 131–145. 2013.

- Renwick, A.; Campbell, R.; Coe, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p. 524–532, 1991.
- Roberge, M. R.; Knowles, R. Ureolysis, immobilization and nitrification in black spruce (*Picea mariana* Mill.)-humus, **Soil Science Society of America Proceedings**, v.30, p. 201–204, 1966.
- Rocha, S. M. B., Mendes, L. W., De Souza Oliveira, L. M., Melo, V. M. M., Antunes, J. E. L., Araujo, F. F., Hungria, M., Araujo, A. S. F. Nodule microbiome from cowpea and lima bean grown in composted tannery sludge-treated soil. **Applied Soil Ecology**, v. 151, p. 103542, 2020.
- Rodrigues, D. R., Silva, A. F. D., Cavalcanti, M. I. P., Escobar, I. E. C., Fraiz, A. C. R., Ribeiro, P. R. D. A., Fernandes-Júnior, P. I. Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 503-512, 2018.
- Roychowdhury, R., Qaiser, T. F., Mukherjee, P., & Roy, M. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain PGP for plant growth promotion. **Proceedings of the national academy of sciences, India section b: biological sciences**, v. 89, n. 1, p. 353-360, 2019.
- Ryan, P. R.; Delhaize, E. Adaptation to Aluminium Toxicity. In: Shabala, S. (Ed.). **Plant Stress Physiology**. 2. ed. Boston: CABI, p. 178–200. 2017.
- Sagar, A., Sayyed, R. Z., Ramteke, P. W., Sharma, S., Marraiki, N., Elgorban, A. M., & Syed, A. ACC deaminase and antioxidant enzymes producing halophilic *Enterobacter* sp. PR14 promotes the growth of rice and millets under salinity stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 26, n. 9, p. 1847-1854, 2020.
- Saïdi, S., Chebil, S., Gtari, M., & Mhamdi, R. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 1099-1106, 2013.
- Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- Sánchez-Cruz, R., Vázquez, I. T., Batista-García, R. A., Méndez-Santiago, E. W., Sánchez-Carbente, M.D. R., Leija, A., Lira-Ruan, V., Hernandez, G., Wong-Villarreal, A., Folch-Mallol, J. L. Isolation and characterization of endophytes from nodules of *Mimosa pudica* with biotechnological potential. **Microbiological research**, v. 218, p. 76-86, 2019.

- Sankhla, I.S.; Meghwal, R.R.; Tak, N.; Tak, A.; Gehlot, H.S. Phenotypic and molecular characterization of microsymbionts associated with *Crotalaria medicagenia*: a native legume of the Indian Thar desert. **Plant Archives**, v. 15, n. 2, p. 1003-1010, 2015.
- Santos, J. O., Antunes, J. E. L., Araújo, A. S. F., Lyra, M. C. C. P., Gomes, R. L. F., Lopes, A. C. A., Figueiredo, M. V. B. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 3, p. 437-444, 2011.
- Sarwar, M.; Kremer, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, n. 2, p. 261 – 269, 1995.
- Sena, P. T. S., do Nascimento, T. R., Lino, J. D. O. S., Oliveira, G. S., Neto, R. A. F., de Freitas, A. D. S., Fernandes-Junior, P.I., Martins, L. M. V. Molecular, physiological, and symbiotic characterization of cowpea rhizobia from soils under different agricultural systems in the semiarid region of Brazil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 1178-1192, 2020.
- Shailendra Singh, G. G. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 2, 2015.
- Shameer, S.; Prasad, T. N. V. K. V. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 3, p. 603–615, 2017.
- Sharaf, H., Rodrigues, R. R., Moon, J., Zhang, B., Mills, K., e Williams, M. A. Unprecedented bacterial community richness in soybean nodules vary with cultivar and water status. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2019.
- Sharma, V., Bhattacharyya, S., Kumar, R., Kumar, A., Ibañez, F., Wang, J., e Pandey, M. K. Molecular basis of root nodule symbiosis between *Bradyrhizobium* and ‘crack-entry’ legume groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plants**, v. 9, n. 2, p. 276, 2020.
- Silveira, J.A.G.; Contado, J.L.; Mazza, J.L.M.; Oliveira, J.T.A. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.9, p.9–23, 1998.
- Singh, P., Singh, R. K., Li, H. B., Guo, D. J., Sharma, A., Lakshmanan, P., Malviya, M.K., Song, X., Solanki, M.K., Verma, K. K., Verma, L., Li, Y. R. Diazotrophic bacteria *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae* promote sugarcane growth by inducing nitrogen uptake and defense-related gene expression. **Frontiers in microbiology**, p. 3272, 2021.

- Singh, S. K.; Jaiswal, S. K.; Vaishampayam, A.; Dhar, B. Physiological behavior and antibiotic response of soybean (*Glycine max* L.) nodulating rhizobia isolated from Indian soils. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 19, p. 2093-2102, 2013.
- Taiwo, L. B., Adesokun, K. T., Olatoberu, F. T., Oyedele, A. O., Ojo, A. O., e Olayinka, A. A. Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and biochar on soil properties and performance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **IFE Journal of Agriculture**, v. 30, n. 3, p. 56-71, 2018.
- Taurian, T., Anzuay, M. S., Angelini, J. G., Tonelli, M. L., Ludueña, L., Pena, D., e Fabra, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil*, 329(1), 421-431.2010
- Tena, W., Wolde-Meskel, E., Degefu, T., e Walley, F. Lentil (*Lens culinaris* Medik.) nodulates with genotypically and phenotypically diverse rhizobia in Ethiopian soils. **Systematic and applied microbiology**, v. 40, n. 1, p. 22-33, 2017.
- Terpolilli, J. J.; Hood, G. A.; Poole, P. S. What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses?. **Advances in microbial physiology**, v. 60, p. 326-389, 2012.
- Toledo, B. F. B. D., Marcondes, J., e Lemos, E. G. D. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 384-391, 2009.
- Vandamme, P.; Goris, J.; Chen, W. M.; De Vos, P.; Willems, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p.507-512, 2002.
- Vedder, E.B. Starch agar-A new culture medium for the gonococcus. **Journal Infectious Diseases**, v.16: p.385, 1915.
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A. The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. In: **Probiotics and plant health**. Springer, Singapore. p. 41-70. 2017.
- Verma, S. C.; Ladha, J. K.; Tripathi, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Varanasi, v. 91, p. 127-141, 2001.
- Verma, M., Mishra, J., & Arora, N. K. Plant growth-promoting rhizobacteria: diversity and applications. In: **Environmental biotechnology: for sustainable future**. Springer, Singapore,. p. 129-173. 2019a

- Verma, P.P.; Shelake, R.M.; Das, S.; Sharma, P.; Kim, J.-Y. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF): potential biological control agents of diseases and pests. In: **Microbial interventions in agriculture and environment**. Springer, Singapore. p. 281-311. 2019 (b)
- Vincent, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule-bacteria**. Oxford, Blackwells Scientific Publications, 164p. 1970.
- Vo, Q.A, Ballard, R.A, Barnett, S.J e Franco, C.M. Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the growth and nodulation of chickpea (*Cicer arietinum*). **Plant and Soil**, v. 466, n. 1, p. 357-371, 2021.
- Wahyudi, A. T., Astuti, R. P., Widyawati, A., Mery, A., Nawangsih, A. A. Characterization of *Bacillus sp.* strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, n. 2, p. 34-40, 2011.
- Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Kalita, M., Karaś, M., Wójcik, M., e Małek, W. Diversity and plant growth promoting properties of rhizobia isolated from root nodules of *Ononis arvensis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 8, p. 1087-1103, 2017.
- Wigley, K., Moot, D., Wakelin, S. A., Laugraud, A., Blond, C., Seth, K., e Ridgway, H. Diverse bacterial taxa inhabit root nodules of lucerne (*Medicago sativa* L.) in New Zealand pastoral soils. **Plant and Soil**, v. 420, n. 1, p. 253-262, 2017.
- Wyngaard, N., Cabrera, M. L., Jarosch, K. A., e Bünemann, E. K. Phosphorus in the coarse soil fraction is related to soil organic phosphorus mineralization measured by isotopic dilution. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 96, p. 107-118, 2016.
- Yano, D. M. Y.; Attili, D. S.; Gatti, M. S. V.; Eguchi, S. Y.; Oliveira, U. M. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade**. Campinas: **Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello"**, 1991.
- Zaheer, A., Mirza, B. S., Mclean, J. E., Yasmin, S., Shah, T. M., Malik, K. A., e Mirza, M. S. Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. **Research in Microbiology**, v. 167, n. 6, p. 510-520, 2016.
- Zaidi, A., Khan, M. S., Rizvi, A., Saif, S., Ahmad, B., Shahid, M. Role of Phosphate-Solubilizing Bacteria in Legume Improvement. In: **Microbes for Legume Improvement**. Springer, Cham, p. 175-197. 2017.

Zgadzaj, R., James, E. K., Kelly, S., Kawaharada, Y., De Jonge, N., Jensen, D. B., Madsen, L.H., Radutoiu, S. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 6, p. e1005280, 2015.

## 8. Capítulo II - Comunidade bacteriana nos nódulos de feijão-caupi cultivados em solos de Pernambuco.

### RESUMO

A nodulação resulta de uma associação hospedeiro-específica entre rizóbios e leguminosas. No entanto, tem sido observada uma comunidade bacteriana rica e diversa no interior dos nódulos. Este estudo avaliou a comunidade bacteriana em nódulos de feijão-caupi cultivados em locais com propriedades de solo distintas para levantar a hipótese de que essas diferenças poderiam influenciar a comunidade bacteriana dentro dos nódulos. Amostras de solo e nódulos de feijão-caupi foram coletadas em seis localidades do Nordeste do Brasil. Houve uma estrutura e composição da comunidade bacteriana diferente comparando solo volumoso e nódulos, com menor diversidade no último. No entanto, as comunidades bacterianas dentro dos nódulos não foram diferentes comparando todos os locais. As comunidades bacterianas encontradas no interior dos nódulos pertenciam a Proteobacteria (*Bradyrhizobium* e *Rhizobium* com 97% e 2,63%, respectivamente), Actinobacteria (*Conexibacter* e *Amycolatopsis* com 0,047% e 0,015%, respectivamente) e Firmicutes (*Bacillus* e *Salipaludibacillus* com 0,042% e 0,040 %, respectivamente). Nossa análise também mostrou que bulk solo e nódulos apresentaram 99,3% e 0,03% de OTUs exclusivas, respectivamente, enquanto esses pools compartilharam 0,4% dos grupos bacterianos. Esses resultados indicam que o caupi selecionou um grupo bacteriano específico que coloniza os nódulos e não é influenciado pelas propriedades do solo.

**Palavras-chave:** Sequenciamento de 16S rRNA; Simbiose; Interações planta-micróbio; Ecologia microbiana.

## Chapter II - Bacterial community in cowpea nodules cultivated in Pernambuco soils.

### ABSTRACT

Nodulation results of a host-specific association between rhizobia and leguminous plants. However, it has been observed a rich and diverse bacterial community inside nodules. This study assessed the bacterial community in nodule of cowpea grown in sites with distinct soil properties to address the hypothesis that these differences could influence the bacterial community inside the nodules. Soil samples and nodules of cowpea were collected in six different sites from Northeastern, Brazil. There was a different bacterial community structure and composition comparing bulk soil and nodules, with lower diversity in the last. However, the bacterial communities inside the nodules were not different comparing all sites. The bacterial communities found inside the nodules belonged to Proteobacteria (*Bradyrhizobium* and *Rhizobium* with 97% and 2.63%, respectively), Actinobacteria (*Conexibacter* and *Amycolatopsis* with 0.047% and 0.015%, respectively), and Firmicutes (*Bacillus* and *Salipaludibacillus* with 0.042% and 0.040%, respectively). Our analysis also showed that bulk soil and nodules presented 99.3% and 0.03% of exclusive OTUs, respectively, while these pools shared 0.4% of the bacterial groups. These results indicate that cowpea selected a specific bacterial group that colonizes the nodules, and it is not influenced by soil properties.

**Keywords:** 16S rRNA sequencing Symbiosis Plant-microbe interactions Microbial ecology

## 8.1 INTRODUÇÃO

A nodulação é um processo específico de leguminosas com bactérias, genericamente conhecidas como rizóbios e envolve a formação de um órgão especial chamado nódulo nas raízes das plantas (LU *et al.*, 2020; STACEY, 2007). Assim, a formação de nódulos radiculares pode indicar o estabelecimento de simbiose, porém, sua eficácia (interação mutualística) é indicada pelo tamanho do nódulo e pela coloração avermelhada no interior do órgão, caso contrário, trata-se de um nódulo não fixador, sendo uma infecção parasitária. Quando efetiva, a simbiose entre leguminosas e rizóbios realiza o processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN). É importante, pois a FBN é reconhecida como o segundo processo biológico mais importante na natureza, contribuindo para o N disponível para as plantas e diminuindo a dependência de fertilizantes nitrogenados (WAGNER, 2011). Por exemplo, a simbiose entre soja e *Bradyrhizobium* contribui, por meio da FBN, com o total de N exigido por essa cultura no campo (BARBOSA *et al.*, 2021).

Embora a nodulação seja reconhecida como um processo específico do hospedeiro, ou seja, um reconhecimento próximo e específico entre bactérias específicas e a planta hospedeira, estudos anteriores recentes relataram que os nódulos radiculares apresentam uma comunidade bacteriana rica e diversificada (SHARAF *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2020; PANG *et al.*, 2021). De fato, Sharaf *et al.*, (2019) encontraram em nódulos de soja diferentes gêneros bacterianos além de *Bradyrhizobium*, como *Pseudomonas* e *Enterobacter*. A presença de outras bactérias dentro dos nódulos pode ser interessante, uma vez que essas bactérias são geralmente promotoras de crescimento de plantas e podem ajudar as plantas contra estresses abióticos (ROCHA *et al.*, 2020; CHOUHAN *et al.*, 2021).

Em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.), um tipo especial de leguminosa utilizada como fonte de proteína, a FBN pode contribuir com 50-90% de sua necessidade de N (NAAB *et al.*, 2009). Para realizar BNF em feijão-caupi, o principal gênero bacteriano encontrado nos nódulos é *Bradyrhizobium* (STACEY, 2007). No entanto, estudos anteriores relataram outros fixadores de N<sub>2</sub> nodulando o feijão-caupi, como *Rhizobium* e *Enterobacter* (ZHANG *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2017). Embora o feijão-fradinho possa hospedar alguns simbioses distintos, outros grupos bacterianos, principalmente promotores de crescimento de plantas, podem ser encontrados no interior dos nódulos. Por exemplo, feijão-caupi cultivado em solo contaminado com cromo mostrou uma comunidade bacteriana distinta dentro dos nódulos com alta abundância de *Bradyrhizobium*, mas também *Microbacterium*, Chitinophagales, Acetobacteraceae e *Bacillus* (ROCHA *et al.*, 2020).

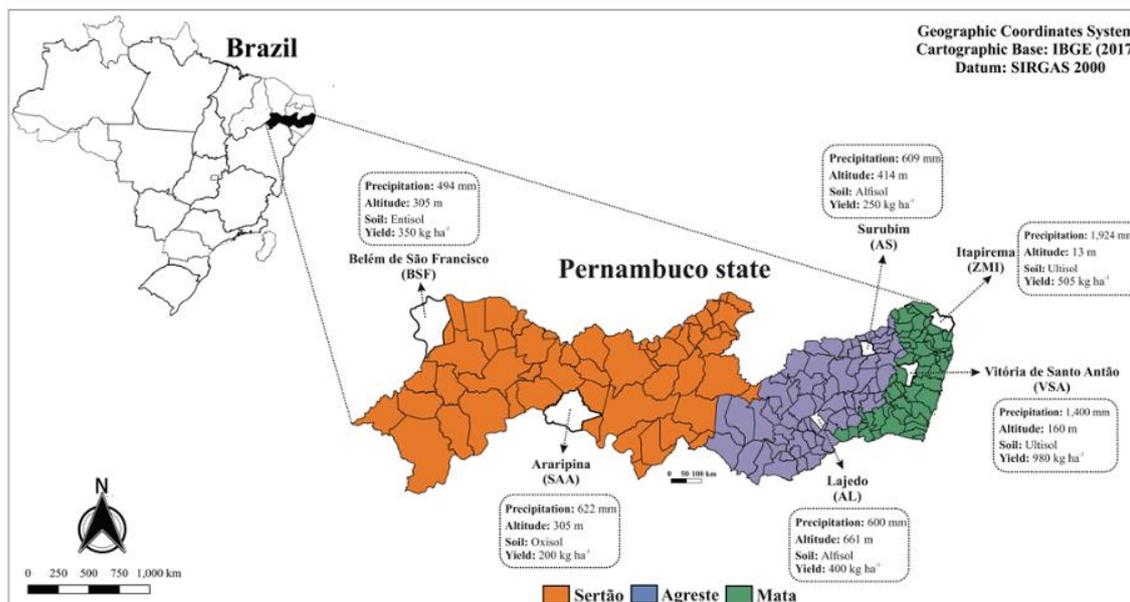
Por outro lado, este estudo realizado por Rocha *et al.*, (2020) avaliaram a comunidade bacteriana em nódulos de feijão-caupi cultivado em solo contaminado por metais. Assim, ainda não está clara a composição da comunidade bacteriana em nódulos de feijão-caupi cultivado em solos não contaminados e em locais onde esta cultura é normalmente cultivada. Por outro lado, mesmo em solos não contaminados, as propriedades do solo, como pH e teor de C orgânico, podem influenciar a comunidade bacteriana nos nódulos, uma vez que esses mesmos fatores alteram as comunidades microbianas do solo onde o feijão-caupi foi cultivado (LOPES *et al.*, 2021). Por exemplo, Lopes *et al.*, (2021) avaliaram a composição e estrutura da comunidade bacteriana ao longo de três regiões distintas no Nordeste, Brasil e observaram diferentes respostas da comunidade bacteriana às propriedades do solo, como pH do solo e C orgânico.

Uma vez que as comunidades bacterianas que colonizam a rizosfera do feijão-caupi foram reconhecidas como importantes para aumentar o desempenho da planta (LOPES *et al.*, 2021), é necessário destrinchar a diversidade, composição e estrutura da comunidade bacteriana dentro dos nódulos do feijão-caupi. Neste estudo, hipotetizamos que solos com diferentes características químicas teriam uma influência distinta na formação da comunidade bacteriana dentro de nódulos de feijão-caupi. Para abordar essa hipótese, usamos o sequenciamento do gene 16S rRNA de alto rendimento para avaliar a comunidade bacteriana dentro de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos de seis locais diferentes em três regiões encontradas no Nordeste do Brasil.

## 8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 8.1.1 Condições do estudo

O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Engenharia Agrícola e Solos (DEAS) da Universidade Federal do Piauí. Seis localidades, com diferentes condições de solo, pertencentes a três regiões ecofisiográficas (Agreste, Sertão e Zona da Mata) do estado de Pernambuco foram selecionadas: Surubim (AS; 07°49'59"S e 35°45'17"W); Lajedo (AL; 08°39'49"S e 36°19'12"W); Belém do São Francisco (BSF; 08°45'14"S e 38°57'57"W); Araripina (SAA; 07°34'34"S e 40° 30' 29"54"W); Vitória de Santo Antão (VSA; 08°06'50"S e 35°17'29"W); Itapirema (ZMI; 07°33'38"S e 35°17'29"W) (Zona da Mata) (Figura 1).



**Figura 1.** Localização geográfica dos locais utilizados para coleta dos solos. O mapa foi criado usando QGIS software version 3.12.1 (<https://qgis.osgeo.org>).

### 8.1.2 Coleta do solo e captura dos nódulos

Em cada localidade foram coletados 15 kg de solos a uma profundidade 0-20cm em março de 2019. Parte das amostras dos solos foram homogêneas e submetidas a análises químicas e físicas realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA. O restante das amostras foi armazenado em sacos plásticos selados e conduzidas ao Laboratório de Solos do DEAS/UFPI. Após serem peneiradas as amostras foram distribuídas em vasos com capacidade de 2kg, onde foi cultivado por vaso cinco sementes da cultivar de feijão-caupi (IPA-206). Decorrido 15 dias da germinação, realizou-se o desbaste, restando uma planta por vaso. Os vasos foram irrigados diariamente com água esterilizada para manter a umidade do solo em 70% da capacidade de campo.

Os nódulos de feijão-caupi foram coletados aos 35 dias após a emergência (período que corresponde a floração da planta). As plantas foram cortadas para separar a parte aérea das raízes. As raízes e o solo aderente a cada planta foram separados utilizando-se uma peneira de malha de 1 mm. Posteriormente, as raízes foram lavadas com um jato suave de água da torneira para remover o solo. Dez nódulos por planta foram selecionados aleatoriamente, lavados em água corrente, pesados e colocados posteriormente em tubos de eppendorf previamente esterilizados para posterior extração de DNA.

Os nódulos foram imersos em 70% (v / v) de etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) por 1 minuto e depois deixados de molho em 6% (v / v) hipoclorito de sódio (NaOCl) por 3 minutos antes de serem cuidadosamente enxaguados seis vezes em água estéril. Já as raízes e a parte aérea das plantas foram medidas, pesadas e em seguida armazenadas em sacos para serem secas em estufa por três dias. Após a secagem foi realizada a pesagem da matéria seca das raízes e da parte aérea de cada planta.

### **8.1.3 Extração e sequenciamento de DNA do solo e dos nódulos.**

O DNA total dos nódulos (0,5 g) e do solo (0,5 g) foi extraído usando o kit de isolamento PowerLyzer PowerSoil DNA (MoBIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A extração do DNA foi realizada em triplicata para cada amostra. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram determinadas usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada com primers específicos da região (515F / 806R) (CAPORASO *et al.*, 2011). Cada reação de PCR de 25 µL continha o seguinte: 12,25 µL de água livre de nuclease (Certified Nuclease-free, Promega, Madison, WI, EUA), 5,0 µL de solução tampão 5x (MgCl<sub>2</sub> 2 mM), 0,75 µL de solução de dNTP (10 mM), 0,75 µL de cada primer (515 YF 40 µM e 806 R 10 µM), 1,0 unidade de Platinum Taq polimerase High Fidelity em uma concentração de 0,5 µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 2,0 µL de modelo DNA. Além disso, uma reação de controle foi realizada adicionando água em vez de DNA. As condições para a reação de PCR foram as seguintes: 95 ° C por 3 min, 35 ciclos a 98 ° C por 20 s, 55 ° C por 20 s e 72 ° C por 30 s, e uma extensão final de 3 min em 72 ° C.

Após a indexação, os produtos de PCR foram limpos com Agencourt AMPure XP - esferas de purificação de PCR (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), de acordo com o manual do fabricante, e quantificados com o kit de ensaio dsDNA BR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em um fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Uma vez quantificadas, as concentrações equimolares de cada biblioteca foram agrupadas em um único tubo. Após a quantificação, a molaridade do pool foi determinada e diluída para 2 nM, desnaturada e, em seguida, diluída para uma concentração final de 8,0 pM com um pico de PhiX de 20% (Illumina, San Diego, CA, EUA) para carregamento no sequenciador Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA).

#### 8.1.4 Processamento dos dados

As leituras de extremidades emparelhadas do gene 16S rRNA foram inicialmente mescladas usando PEAR (ZHANG *et al.*, 2014). Em seguida, as sequências mescladas foram processadas usando QIIME 2 versão 2019.10 (BOLYEN *et al.*, 2019). Em primeiro lugar, as sequências foram demultiplexadas e o controle de qualidade foi realizado usando DADA2 (CALLAHAN *et al.*, 2016), usando o método de consenso para remover quaisquer sequências quiméricas remanescentes e de baixa qualidade. Posteriormente, as amostras foram rarefeitas para 49.200 sequências, seguindo o número da amostra mais baixa, e sequências de singletons, dupletons, cloroplasto e mitocôndrias foram removidos de análises posteriores. A afiliação taxonômica foi realizada com 97% de similaridade usando o banco de dados Silva v. 132 (QUAST *et al.*, 2013), e a matriz gerada foi posteriormente usada para análises estatísticas. As sequências do gene 16S rRNA foram depositadas no banco de dados do NCBI Sequence Archive sob os números de acesso PRJNA646266 e PRJNA758404.

#### 8.1.5 Análise dos dados

Os dados foram inicialmente checados quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade da variância pelo teste de Levene, que indicou distribuição não normal. Assim, primeiro usamos a análise canônica (CA) para comparar a comunidade bacteriana entre as amostras de solo e nódulos. Em seguida, executamos a análise de correspondência canônica (CCA) para o solo a granel e os nódulos separados, para avaliar a correlação entre a estrutura da comunidade bacteriana com os parâmetros do solo e os parâmetros da planta para o solo a granel e os dados dos nódulos, respectivamente. A seleção direta (FS) e o teste de permutação de Monte Carlo foram aplicados com 1.000 permutações aleatórias para verificar a significância da correlação entre propriedades do solo e parâmetros da planta com a comunidade bacteriana. O gráfico CCA foi gerado usando Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, Holanda). Usamos PERMANOVA (Anderson) para testar se nicho, região e local abrigavam comunidades microbianas significativamente diferentes. O índice filogenético de Faith foi calculado em QIIME2 e a riqueza foi calculada com base na matriz taxonômica no nível de OTU usando o software PAST 4.01 (HAMMER *et al.*, 2001). Em seguida, comparamos a composição das comunidades bacterianas entre nichos e locais usando o software Statistical Analysis of Metagenomic Profile (STAMP) (PARKS *et al.*, 2014). Para isso, a tabela OTU no filo e

nível OTU gerada a partir de QIIME2 foi usada como entrada. Os valores de P foram calculados usando um teste de Tukey-Kramer bilateral, e a correção foi feita usando a taxa de descoberta falsa de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI e HOCHBERG 1995).

## 8.2 RESULTADOS

As propriedades dos solos mostraram grande variabilidade entre as áreas (Tabela 1). O solo de Surubim apresentou maiores valores para a maioria dos parâmetros químicos (pH, P, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, SB, CTC, V) analisados. Por outro lado, os solos das áreas de Zona da Mata apresentaram maiores valores de C orgânico. As temperaturas observadas entre as áreas mostraram variação com elevação no Sertão e redução no Agreste.

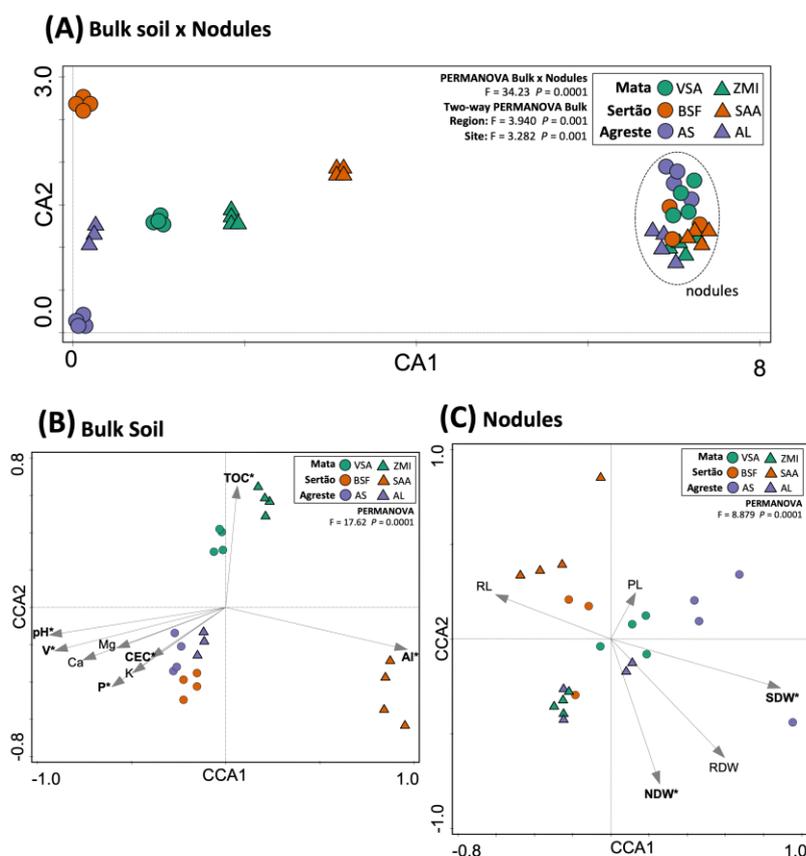
**Tabela 1.** Propriedades do solo nas localidades das mesorregiões de Pernambuco ( Zona da Mata , Agreste e Sertão) analisadas.

	Zona da Mata		Sertão		Agreste	
	VSA	ZMI	BSF	SAA	AS	AL
pH	6,4 a	5,2 b	6,6 a	4,5 c	6,5 a	6,5 a
P (mg kg <sup>-1</sup> )	25 c	13 d	36 c	3,0 e	175 a	125 b
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	2,6 b	0,7 d	2,4 b	0,3 d	4,5 a	2,1 bc
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	1,3 b	0,4 d	0,8 c	0,4 d	2,0 a	0,9 c
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	0 b	0,1 b	0 b	0,5 a	0 b	0 b
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	0,11 a	0,04 d	0,17 a	0,02 d	0,07 c	0,04 cd
K <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	0,28 b	0,02 c	0,19 b	0,03 c	1,40 a	0,37 b
SB (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	4,3 b	1,3 d	3,7 b	0,9 d	7,7 a	2,5 c
CTC (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	6,4 b	3,5 d	4,5 c	4,5 c	9,7 a	4,5 c
V (%)	68 b	34 c	81 a	21 d	80 a	66 b
m (%)	0 c	8,3 b	0 c	62,1 a	0 c	0 c
COT (g kg <sup>-1</sup> )	11 a	7,5 b	3,2 c	4,8 c	4 c	8,6 b
Areia (%)	90 a	89 a	75 b	80 b	68 c	63 c
Silte (%)	2 b	4 b	15 a	1,5 b	16 a	15 a
Argila (%)	8 d	7 d	9 cd	19 a	15 b	12 c
Temperatura (°C)	27,5 b	27 b	30 a	31 a	25 c	25 c

Legenda: SB - soma das bases; CTC - capacidade de troca de catiônica; V (%) - saturação por bases; m (%) - saturação por Al<sup>3+</sup>; COT - carbono orgânico total; VSA - Vitória de Santo Antão; ZMI - Itapirema; AS - Surubim; AL- Lajedo; BSF - Belém do São Francisco; SAA - Araripina. Diferentes letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre as áreas. A comparação é baseada no teste one-way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey (p<0,05).

A análise de correspondência canônica (CCA) separou a comunidade bacteriana dos nódulos em relação ao solo (PERMANOVA  $F = 34,23$ ,  $p = 0,0001$ ) e entre os nódulos obtidos nas plantas cultivadas (PERMANOVA  $F = 3,282$ ,  $p = 0,001$ ) (Figura 2A). Quando se comparou somente o solo, observou-se uma separação da comunidade entre as áreas (Figura 2B). Assim, as comunidades bacterianas nos solos da Zona da Mata se correlacionaram com o C orgânico, enquanto as outras áreas se correlacionaram com o pH, V, Ca, Mg, P, CTC e K. A exceção deveu-se a comunidade bacteriana do solo de Araripina que apresentou correlação com Al. Na comparação das comunidades bacterianas nos nódulos, observou-se a separação entre as áreas (Figura 2C).

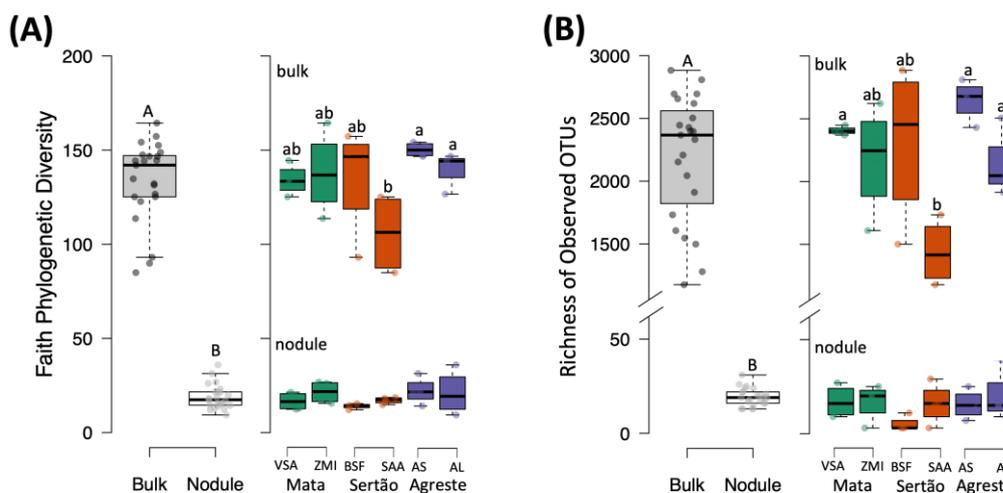
A exceção foi para os nódulos coletados do solo Itapirema e Lajedo que apresentam comunidades bacterianas semelhantes. Os parâmetros vegetativos se correlacionaram com as comunidades bacterianas dos nódulos da região do Agreste e Vitória de Santo Antão na zona da mata em relação a matéria seca da raiz e do nódulo, bem como da parte aérea. Já nas localidades do sertão que foram analisadas o fator vegetativo que teve influência foi o comprimento da raiz.



**Figura 2.** Estrutura e diversidade da comunidade bacteriana no solo e nódulos ao longo de três ecorregiões distintas sob cultivo de feijão-caupi com base no gene 16S rRNA. (A) Análise canônica da estrutura da comunidade bacteriana comparando solo e nódulos. (B) Análise de correspondência canônica dos padrões da

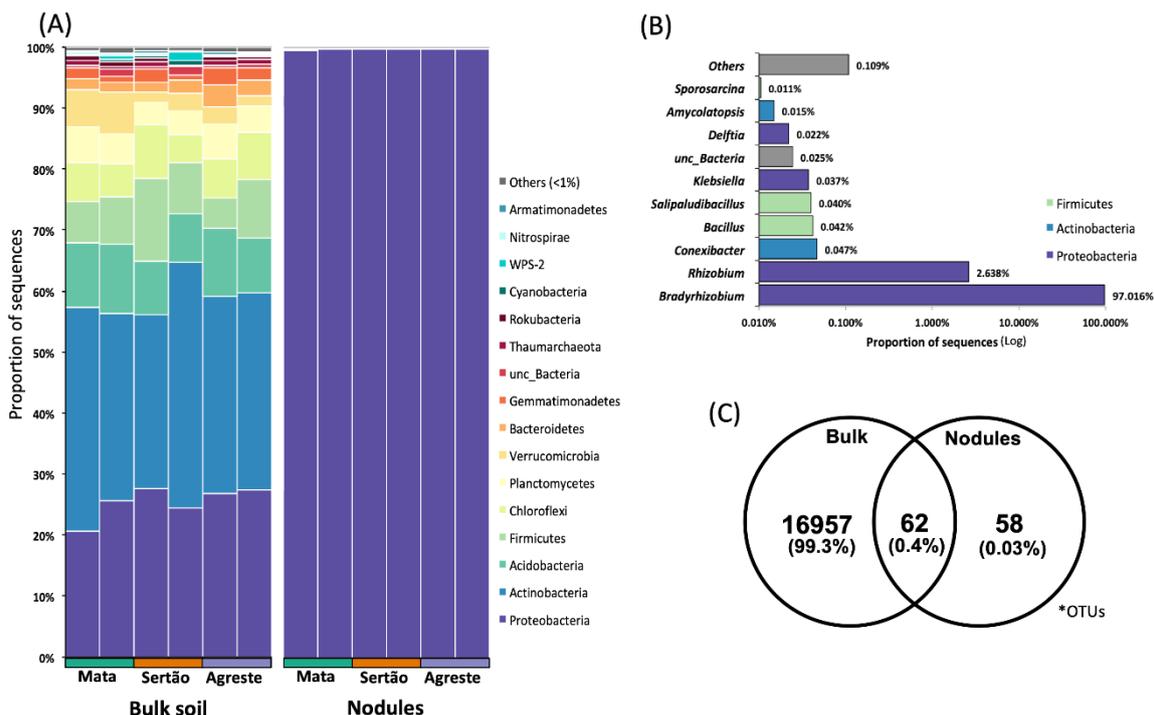
comunidade bacteriana e parâmetros químicos do solo no solo a granel. (C) Análise de correspondência canônica dos padrões da comunidade bacteriana e parâmetros de desempenho da planta em nódulos de feijão-caupi. As setas nas análises CCA indicam a correlação entre os parâmetros ambientais / da planta e o perfil microbiano. Os asteriscos indicam fatores significativos.

Ao avaliar a diversidade e a riqueza, observou-se que o solo apresentou maiores valores significativos em comparação a comunidade bacteriana nos nódulos (Figura 3A, B). Além disso, observou-se que a diversidade e riqueza bacteriana variou entre o solo não-rizosférico, enquanto não houve diferenças entre as comunidades bacterianas nos nódulos.



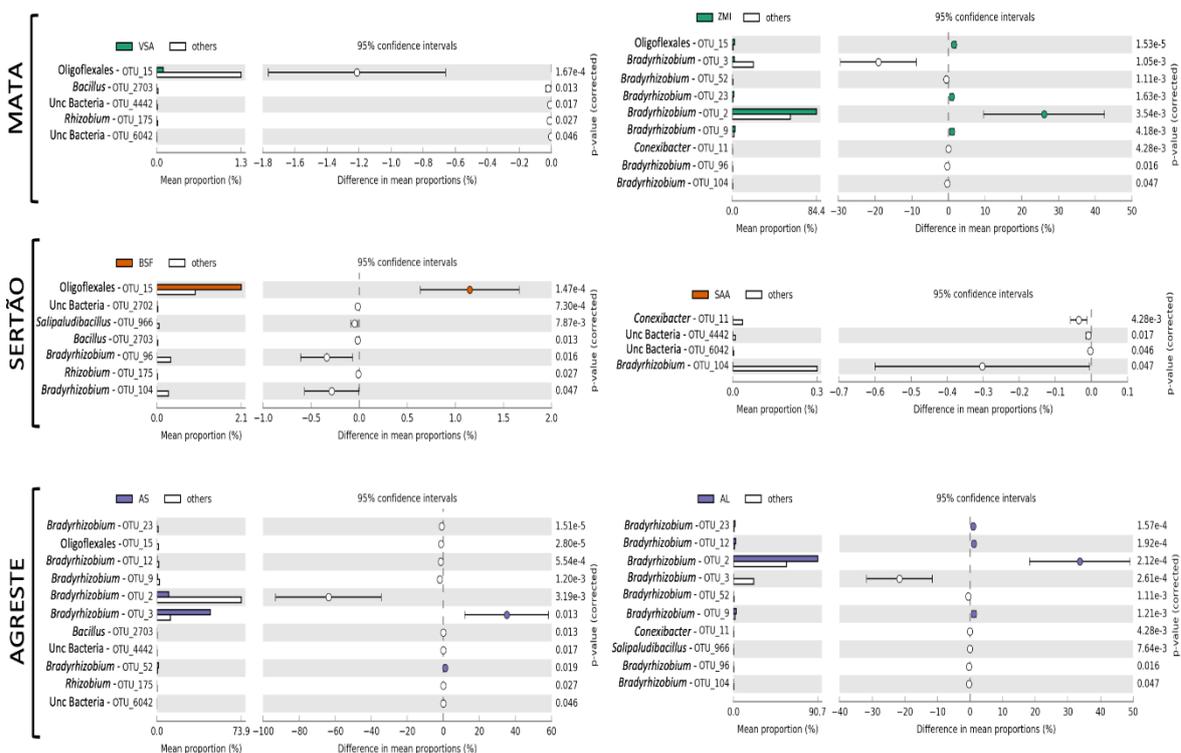
**Figura 3.** Diversidade filogenética (A) e riqueza da comunidade bacteriana em nível de OTU (B). As barras de erro representam o desvio padrão. Diferentes letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre cada site com base no teste HSD de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A comunidade bacteriana do solo apresentou abundância de vários filos, com predominância respectivamente de Actinobactérias, Proteobactérias, Acidobactérias e Firmicutes (Figura 4A). Estes filos apresentaram abundâncias variadas de acordo com as áreas amostradas. Por outro lado, a comunidade bacteriana nos nódulos mostrou uma redução geral no número de filos representados sendo dominada por Proteobactérias, com alta e significativa abundância de *Bradyrhizobium* (97%) e *Rhizobium* (2.6%) (Figura 4B). De forma interessante, os nódulos apresentaram abundância de outros grupos tais como, *Conexibacter*, *Bacillus*, *Salipaludibacillus* e *Klebsiella*. A análise do diagrama de Venn mostrou grupos exclusivos de bactérias no solo (99.3% da comunidade) e nódulos (0.03% da comunidade), enquanto houve um compartilhamento de 0.4% de grupos bacterianos entre ambos (Figura 4C).



**Figura 4.** Composição da comunidade bacteriana no solo e nódulos com base no gene 16S rRNA. (A) abundância diferencial de filos para o solo e nódulos de feijão-caupi. (B) dez principais grupos de bactérias mais abundantes em nódulos. (C) Diagrama de Venn mostrando a proporção de OTUs exclusivos e compartilhados entre o solo e os nódulos.

A partir da tabela de OTUs verificou-se que há uma variação de abundância de gêneros bacterianos dos nódulos dentro de uma região e entre as regiões avaliadas (Figura 5).



**Figura 5.** Gráfico de dispersão mostrando a abundância diferencial de OTUs nos nódulos. As comparações são baseadas no teste t de Welch com correção de Benjamini-Hochberg ( $P < 0,05$ ).

A comparação entre regiões demonstrou uma maior abundância da ordem *Oligoflexales* e do gênero *Bradyrhizobium*. *Oligoflexales* é mais abundante em Belém de São Francisco (BSF) e o gênero *Bradyrhizobium* são mais abundantes em Zona da Mata de Itapirema (ZMI), Agreste de Salgueiro (AS) e Agreste de Lajedo (AL). Dentre os *Bradyrhizobium* encontrados nessas três localidades destacam-se a OTU 2 em ZMI e AL e OTU 3 em AS. Vitória de Santo Antão (VSA) e Sertão de Araripe Araripina (SAA) não demonstraram possuir um gênero de maior abundância em relação as demais localidades comparadas. VSA também se caracterizou por não possuir representantes de *Bradyrhizobium*.

### 8.3 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo sequenciamento do gene 16SrRNA mostraram que, comparando as regiões avaliadas, o solo apresenta uma maior diversidade bacteriana, em relação aos nódulos. Estes resultados são confirmados por outros estudos que demonstraram que o solo possui uma comunidade bacteriana complexa influenciada pelos fatores bióticos e abióticos, enquanto os nódulos são mais seletivos, sendo determinado principalmente pela interação com as espécies de plantas (XIAO *et al.*, 2017, CLUÁ *et al.*, 2018).

Os dados mostraram uma correlação positiva entre COT e a comunidade bacteriana no solo da região da zona da mata e isto aconteceu devido a alta fertilidade do Argissolo (JESUS *et al.*, 2019) o que contribui com nutrientes para os microrganismos (PERREIRA *et al.*, 2018). Por outro lado, a presença elevada do alumínio  $Al^{+3}$  e o baixo valor de pH foram os fatores determinantes para separar a comunidade bacteriana nos nódulos das plantas no solo do Sertão (Araripina) em comparação com as demais regiões. O  $Al^{+3}$  é um elemento tóxico que atua inibindo o crescimento da raiz principalmente em solos ácidos (RYAN e DELHAIZE, 2017), com isso a sua presença em alta quantidade pode interferir na rizosfera e influenciar no recrutamento de bactérias. Baixos valores de pH ocasionam menor quantidade de nutrientes disponíveis, tais como P, N e K, interferindo na comunidade bacteriana (MENDES *et al.*, 2015).

A elevada abundância dos filos Actinobacteria e Proteobacteria no solo nas três regiões analisadas confirmam a adaptabilidade desses grupos às condições ambientais adversas tais

como solos ácidos, pobres em nutrientes e temperaturas medianas a elevadas (LIRA *et al.*, 2021). O filo Actinobacteria apresenta oligotrofia e predomina em ambientes pobres em nutrientes (REN *et al.*, 2021), se caracterizando por ser termofílico, acidofílico, halofílico, além de possuírem metabolismo secundário (LOPES *et al.*, 2018) e produção de antibióticos (ELBENDARY, *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020). Este filo também atua no sequestro de carbono no solo e aumentam a disponibilidade de nitrogênio através da decomposição de resíduos (BAO *et al.*, 2021). As proteobacterias são relacionadas a uma ampla variedade de funções nos ciclos do C, N e S (CASTANHEDA e BARBOSA, 2017).

Estudos recentes têm revelado que a distribuição e a diversidade dos microssimbiontes nas leguminosas, bem como sua capacidade de fixar nitrogênio são moldados pelo genótipo da planta, pelas propriedades do solo e localização geográfica (MOHAMMED *et al.*, 2018, PUOZOA *et al.*, 2019), como já foi observado na região semiárida brasileira (SENA *et al.*, 2020).

Nos nódulos, a predominância do filo Proteobacteria corrobora com estudos anteriores que destacam que esse grupo é o principal simbionte das leguminosas. Neste filo destaca-se o gênero *Bradyrhizobium* que são comumente encontrados dentro dos nódulos de feijão-caupi (MARINHO *et al.*, 2017) e que apresenta tolerância às flutuações de temperatura do solo (NDUNGU *et al.*, 2017).

A maior abundância do *Bradyrhizobium* nos nódulos do feijão-caupi pode estar relacionada ao fato dessa bactéria se associar com plantas do gênero *Vigna* (NDUNGU *et al.*, 2017; PUOZAA *et al.*, 2019). Embora verifique-se uma predominância de *Bradyrhizobium* nodulando o feijão-caupi, estudos tem demonstrado que essa leguminosa se associa com uma variedade muito mais diversa de bactérias, que incluem rizóbios e não-rizóbios (JOHNSON, 2019; MARTINEZ -HIDALGO e HIRSCH, 2017).

Essa diversificação de microrganismos é confirmada pela presença e/ou dominância da ordem Oligoflexales pertencente ao filo Proteobacteria nos nódulos do feijão-caupi em algumas regiões analisadas. O enriquecimento dos nódulos por Oligoflexales, nas três regiões em estudo, demonstra que essa ordem está presente em ambientes com poucos nutrientes, onde apresenta uma versatilidade metabólica e, devido ao crescimento lento, sugere adaptabilidade às condições ambientais adversas (Nakai *et al.*, 2014; NAKAI *et al.*, 2016).

Os gêneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Conexibacter* também foram encontrados nos nódulos do feijão-caupi. Esses gêneros são considerados microrganismos promotores de crescimento e apresentam características próprias que os permitem se adaptar aos mais

diversos tipos de ambientes. *Rhizobium* é um gênero também pertencente ao filo Proteobacteria e que se caracteriza como nodulares, fixadores de nitrogênio e promotores de crescimento. No entanto, diferente do outro gênero, produz substâncias de proteção aos estresses ambientais tais como solos ácidos denominadas exopolissacarídeos, o que permite que possua crescimento rápido (Patil et al., 2017).

Além do filo Proteobacteria observou-se a presença de Firmicutes, representado pelo gênero *Bacillus*. O *Bacillus* consiste no grupo não rizobiano mais abundante encontrado em nódulos que está relacionado a promoção do crescimento das plantas através da aquisição de nutrientes, produção de fitohormônios e supressão de patógenos (FIGUEIREDO et al., 2016; ALOO et al., 2019; HUANG et al., 2022). A presença do filo Actinobacteria também foi observado nos nódulos analisados. O gênero *Conexibacter* foi verificado nos nódulos obtidos nas três regiões estudadas. As bactérias desse gênero se caracterizam por crescerem em ambientes de altas temperaturas e com variações de pH, o que as torna adaptadas as variações ambientais (DOBROVOLSKAYA et al., 2020). Além disso, o gênero *Conexibacter* apresenta catalase positiva, atuando no processo de proteção (MONCIARDINI et al., 2003).

#### 8.4 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o solo exibe uma maior diversidade de bactérias e que os nódulos apresentam uma predominância de Proteobacterias (*Bradyrhizobium*). Além disso verificou-se que as diferentes condições do solo não influenciaram na comunidade bacteriana. A comunidade bacteriana identificada nos nódulos está relacionada a promoção do crescimento vegetal o que é essencial para ajudar os produtores de feijão-caupi a aumentar a produção dessa leguminosa.

#### 8.5 REFERÊNCIAS

- Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, v. 219, p. 26-39, 2019.
- Bao, Y., Dolfing, J., Guo, Z., Chen, R., Wu, M., Li, Z., Lin, X., Feng, Y. Important ecophysiological roles of non-dominant Actinobacteria in plant residue decomposition, especially in less fertile soils. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2021.

- Barbosa, J. Z., Hungria, M., da Silva Sena, J. V., Poggere, G., dos Reis, A. R., & Corrêa, R. S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium spp.* in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, 2021.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Caporaso, J. G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.
- Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods** 13, 581–583, 2016.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., Knight, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of National Academy of Science**. 108, 4516–4522, 2011.
- Dobrovolskaya, T. G., Golovchenko, A. V., Lysak, L. V., & Yurchenko, E. N. Taxonomic structure of bacterial communities of rhizospheric soil under bogs' plants. **Moscow University Soil Science Bulletin**, v. 75, n. 2, p. 93-100, 2020.
- Elbendary, A. A., Hessain, A. M., El-Hariri, M. D., Seida, A. A., Moussa, I. M., Mubarak, A. S., Kabli, S.A., Hemeg, H. A., El Jakee, J. K. Isolation of antimicrobial producing actinobacteria from soil samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 44-46, 2018.
- Castañeda, L. E., Barbosa, O. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. **PeerJ**, v. 5, p. e3098, 2017.
- Chouhan, G. K., Verma, J. P., Jaiswal, D. K., Mukherjee, A., Singh, S., de Araujo Pereira, A. P.; Singh, B. K. Phytomicrobiome for promoting sustainable agriculture and food security: Opportunities, challenges, and solutions. **Microbiological Research**, v. 248, p. 126763, 2021.
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., Blanco, F. A. Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 125, 2018.

- Figueiredo, M. D. V. B., Bonifacio, A., Rodrigues, A. C., de Araujo, F. F. Plant growth-promoting rhizobacteria: key mechanisms of action. In: **Microbial-mediated induced systemic resistance in plants**. Springer, Singapore, p. 23-37. 2016.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontology Electronica** v.4, p.9, 2001.
- Huang, Z., Ruan, S., Sun, Y., Cheng, X., Dai, J., Gui, P., Yu, M., Zhong, Z., Wu, J. Bacterial inoculants improved the growth and nitrogen use efficiency of *Pyrus betulifolia* under nitrogen-limited conditions by affecting the native soil bacterial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104285, 2022.
- Jesus, K. N., Albuquerque, E. R. G. M., Sales, A. T., Sampaio, E. V. D. S. B. Estoques de carbono em solos de Pernambuco, Brasil (Carbon stocks in soil of Pernambuco state, Brazil). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 12, n. 3, p. 714-721, 2019.
- Johnson, G. High throughput DNA extraction of legume root nodules for rhizobial metagenomics. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2019.
- Leite, J., Fischer, D., Rouws, L. F., Fernandes-Júnior, P. I., Hofmann, A., Kublik, S., Schlöter, M., Xavier, G. R., Radl, V. Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2064, 2017.
- Lyra, M., Do Carmo, C. D., Taketani, R. G., Freitas, A. D. S., Silva, C. E. E., Mergulhão, A. C., Silva, M.L.R.B., Antunes, J.E.L.S., Araújo, A.S.F. Giachetto, P. F. Structure and diversity of bacterial community in semiarid soils cultivated with prickly-pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.
- Lopes, J., Silva, V., Cavalcante, F., Martins, S. C., Martins, C. Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por actinobactérias oriundas do solo e serrapilheira de região semiárida. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 27, p. 35-50, 2018.
- Lopes, L.S., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., De Souza Oliveira, L. M., Melo, V. M. M., De Araujo Pereira, A. P., Costa, A. F., Oliveira, J.P., Martínez, C. R., Figueiredo, M. V.B., Araujo, A. S. F. Distinct bacterial community structure and composition along different cowpea producing ecoregions in Northeastern Brazil. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.
- Lu, S., Guan, X., & Liu, C. Electricity-powered artificial root nodule. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

- Marinho, R. D. C. N., Ferreira, L. D. V. M., Silva, A. F. D., Martins, L. M. V., Nóbrega, R. S. A., & Fernandes-Júnior, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, p. 273-281, 2017.
- Martínez-Hidalgo, P., Hirsch, A. M. The nodule microbiome: N<sub>2</sub>-fixing rhizobia do not live alone. **Phytobiomes**, v. 1, n. 2, p. 70-82, 2017.
- Mendes, L. W., de Lima Brossi, M. J., Kuramae, E. E., & Tsai, S. M. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151-160, 2015.
- Mohammed, M., Jaiswal, S. K., & Dakora, F. D. Distribution and correlation between phylogeny and functional traits of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.)-nodulating microsymbionts from Ghana and South Africa. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2018.
- Monciardini, P., Cavaletti, L., Schumann, P., Rohde, M., Donadio, S. *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, n. 2, p. 569-576, 2003.
- Naab, J. B., Chimphango, S., Dakora, F. D. N<sub>2</sub> fixation in cowpea plants grown in farmers' fields in the Upper West Region of Ghana, measured using <sup>15</sup>N natural abundance. **Symbiosis**, v. 48, n. 1, p. 37-46, 2009.
- Nakai, R., Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Karray, F., Sayadi, S., Isoda, H., Naganuma, T. *Oligoflexus tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, filamentous bacterium of a novel proteobacterial lineage, and description of Oligoflexaceae fam. nov., Oligoflexales ord. nov. and *Oligoflexia classis* nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt 10, p. 3353, 2014.
- Nakai, R., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Baba, T., Nishijima, M., Karray, F., [Sayadi, S.](#), Isoda, H., Naganuma, T., Niki, H. Genome sequence and overview of *Oligoflexus tunisiensis* Shr3 T in the eighth class Oligoflexia of the phylum Proteobacteria. **Standards in genomic sciences**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2016.
- Ndungu, S. M., Messmer, M. M., Ziegler, D., Gamper, H. A., Mészáros, É., Thuita, M., Vanlauwe, B., Frossard, E., Thonar, C. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 261, p. 161-171, 2018.
- Pang, J., Palmer, M., Sun, H. J., Seymour, C. O., Zhang, L., Hedlund, B. P., & Zeng, F. Diversity of Root Nodule-Associated Bacteria of Diverse Legumes Along an Elevation

- Gradient in the Kunlun Mountains, China. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 633141, 2021.
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014.
- Patil, A., Kale, A., Ajane, G., Sheikh, R., & Patil, S. Plant growth-promoting Rhizobium: mechanisms and biotechnological prospective. In: **Rhizobium biology and biotechnology**. Springer, Cham, p. 105-134. 2017.
- Pereira, A. P., Zagatto, M. R., Brandani, C. B., Mescolotti, D. D. L., Cotta, S. R., Goncalves, J. L., & Cardoso, E. J. *Acacia* changes microbial indicators and increases C and N in soil organic fractions in intercropped *eucalyptus* plantations. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 655, p. 1-13, 2018.
- Puozaa, D. K., Jaiswal, S. K., Dakora, F. D. Phylogeny and distribution of Bradyrhizobium symbionts nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their association with the physicochemical properties of acidic African soils. **Systematic and applied microbiology**, v. 42, n. 3, p. 403-414, 2019.
- Ren, C., Zhou, Z., Guo, Y., Yang, G., Zhao, F., Wei, G., Han, X., Feng, L., Feng, Y., Ren, G. Contrasting patterns of microbial community and enzyme activity between rhizosphere and bulk soil along an elevation gradient. **Catena**, v. 196, p. 104921, 2021.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research** 4, 590-596, 2013.
- Rocha, S. M. B., Mendes, L. W., de Souza Oliveira, L. M., Melo, V. M. M., Antunes, J. E. L., Araujo, F. F., Hungria, M., Araujo, A. S. F. Nodule microbiome from cowpea and lima bean grown in composted tannery sludge-treated soil. **Applied Soil Ecology**, v. 151, p. 103542, 2020.
- Ryan, P. R.; Delhaize, E. Adaptation to Aluminium Toxicity. In: Shabala, S. (Ed.). **Plant Stress Physiology**. 2. ed. Boston: CABI, p. 178–200. 2017.
- Sena, P. T. S., do Nascimento, T. R., Lino, J. D. O. S., Oliveira, G. S., Neto, R. A. F., de Freitas, A. D. S., Fernandes-Junior, P.I., Martins, L. M. V. Molecular, physiological, and symbiotic characterization of cowpea rhizobia from soils under different agricultural systems in the semiarid region of Brazil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 1178-1192, 2020.

- Sharaf, H., Rodrigues, R. R., Moon, J., Zhang, B., Mills, K., & Williams, M. A. Unprecedented bacterial community richness in soybean nodules vary with cultivar and water status. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2019.
- Stacey, G. The *Rhizobium*-legume nitrogen-fixing symbiosis. In: **Biology of the nitrogen cycle**. Elsevier, p. 147-163. 2007.
- Xiao, X., Chen, W., Zong, L., Yang, J., Jiao, S., Lin, Y., Wang, E., Wei, G. Two cultivated legume plants reveal the enrichment process of the microbiome in the rhizocompartments. **Molecular ecology**, v. 26, n. 6, p. 1641-1651, 2017.
- Wagner, S. C. Biological nitrogen fixation. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, p. 15, 2011.
- Yang, S., Wu, L., Wu, B., Zhang, Y., Wang, H., Tan, X. Diversity and structure of soil microbiota of the Jinsha earthen relic. **PloS one**, v. 15, n. 7, p. e0236165, 2020.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614-620, 2014.

## ANEXOS

### Anexo 1

Formulário de avaliação morfo-fisiológica e bioquímica das bactérias da coleção de culturas de microrganismos multifuncionais da UFPI, modificado de Hungria e Silva (2011)

Projeto:

Responsável:

Identificação Inicial:

Identificação Final:

As características dos itens 3 a 14 devem ser observadas na fase final de avaliação, a partir da anotação do diâmetro das colônias.

**1. Manifestação do Crescimento (colônias isoladas):**

- ( ) rápida (até 3 dias) ( ) intermediária (4 a 5 dias)  
 ( ) lenta (6 a 9 dias) ( ) muito lenta (acima de 10 dias)

**2. Tamanho (diâmetro das colônias):**

\_\_\_\_\_mm aos \_\_\_\_\_dias (na manifestação das colônias isoladas) rápido – 5 dias intermediário – 8 dias \_\_\_\_mm aos \_\_\_\_dias (no final da avaliação) lento – 12 dias muito lento – 15 dias

**3. Alteração do pH no meio YMA com o indicador Azul de Bromotimol:**

- ( ) ácido (amarelo) ( ) neutro (sem alteração de cor) ( ) alcalino (azul)

**4. Forma da colônia:**

- ( ) puntiforme (até 1 mm) ( ) circular ( ) irregular

**5. Elevação da colônia:**

- ( ) plana ( ) lenticular ( ) convexa ( ) pulvinada (drop-like)

**6. Borda da colônia:**

- ( ) inteira ( ) ondulada ( ) lobada ( ) denteada ( ) filamentosa

**7. Superfície da colônia:**

- ( ) lisa ( ) rugosa ( ) papilada

**8. Produção de muco:**

- ( ) escassa ( ) pouca ( ) moderada ( ) abundante

**9. Consistência da massa de crescimento:**

- ( ) seca ( ) aquosa ( ) gomosa (creme) ( ) viscosa (elástica) ( ) butírica (manteiga)

**10. Detalhes ópticos:**

- ( ) transparente ( ) translúcido ( ) opaco

**11. Cromogênese da colônia em meio YMA com indicador Azul de Bromotimol:**

- ( ) incolor (lupa) ( ) branco (olho nu) ( ) creme ( ) amarelo ( ) rosa

**12. Cromogênese da colônia em meio YMA com corante Vermelho Congo:**

( ) incolor (lupa) ( ) branco ( ) rosado (levemente) ( ) rosa  
(bebê) ( ) avermelhado (centro) ( ) vermelho

**13. Coloração de Gram:**

( ) Gram-positiva cor violeta ( ) Gram-negativa cor vermelha

**14. Atividade UREASE**

( ) positivo ( ) negativo

**15. Atividade PROTEASE**

( ) positivo ( ) negativo

**16. Atividade AMILASE**

( ) positivo ( ) negativo

**17. Atividade LIPASE**

( ) positivo ( ) negativo

**18. Atividade SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

( ) positivo ( ) negativo

Diâmetro de halo final: \_\_\_\_\_

Diâmetro da colônia final: \_\_\_\_\_

**19. Teste de CATALASE**

( ) positivo ( ) negativo

**20. Teste de GELATINASE**

( ) positivo ( ) negativo

**21. Produção de ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)**

( ) positivo ( ) negativo

**22. Carboxi-metil-celulose (CMC)**

( ) positivo ( ) negativo

**23. Lipase**

( ) positivo ( ) negativo

**Outras informações (registrar no verso)**

**Data:** / / \_\_\_\_\_ **Responsável:** \_\_\_\_\_