

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

**Caracterização de isolados rizobianos noduladores de
feijão-fava em solos dos estados do Ceará, Maranhão e
Piauí**

MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

**TERESINA
2019**

MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM
Licenciada em Ciências Biológicas

**Caracterização de isolados rizobianos noduladores de
feijão-fava em solos dos estados do Ceará, Maranhão e
Piauí**

Orientador:
Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

TERESINA
2019

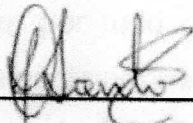
Caracterização de isolados rizobianos noduladores de feijão-fava em solos dos estados do Ceará, Maranhão e Piauí

Marineide Rodrigues do Amorim

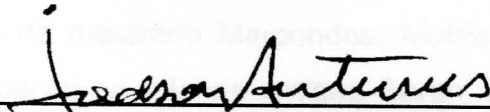
Licenciada em Ciências Biológicas

Aprovada em 13/02/2019

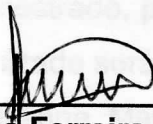
Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Jardel Oliveira Santos – UFMA



Prof. Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes - CCA/ UFPI



Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo – CCA/UFPI
Orientador

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

A524c Amorim, Marineide Rodrigues do
Caracterização de isolados rizobianos noduladores de feijão-
fava em solos dos Estados do Ceará, Maranhão e Piauí. / Mari-
neide Rodrigues do Amorim - 2019.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pro-
grama de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Teresina,
2019.

Orientação: Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

1. *Phaseolus lunatus* L., 2 .Diversidade filogenética 3.Bactérias
promotoras de crescimento I.Título.

CDD 635.651

AGRADECIMENTOS

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 na hora exata.

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

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

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

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

A Dra. Louise, pela amizade, por todo o cuidado, paciência e orientação a mim direcionada. Obrigada por me acalmar nos momentos de desespero e ansiedade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos de mestrado Marcondes, Matheus e Gabriel pela convivência, amizade e em especial as minhas amigas Sarah Giovanna, Milena, Samíria pela parceria, companheirismo nos momentos alegres e difíceis e o carinho a mim destinado. A Samara, amiga de mestrado, pela força, compreensão e que embora a convivência tenha sido curta a amizade será para sempre.

Aos meus queridos amigos Claudyanne, Mariane, Francisco Macêdo, Junia, Delanio, Regina, Ingrid, 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 por toda ajuda, ensinamentos, compreensão, companheirismo, incentivo e amizade. Você foi essencial nessa minha conquista.

Ao João Pedro, pela amizade, incentivo, brigas, momentos de descontração, por me ajudar todas as vezes que precisei. Sem você não teria conseguido.

Ao Antônio Victor e Igda Caroline pela parceria, amizade, paciência em me acompanhar e ajudar nas práticas de laboratório.

A Dona Nilvânia pela amizade, companhia diária e ajuda em todos os momentos.

Um agradecimento especial a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Phaseolus lunatus</i> L.....	14
2.2 A simbiose rizóbio- <i>Phaseolus lunatus</i> L.....	15
2.3 Diversidade de rizóbios associados ao <i>Phaseolus lunatus</i> L.....	16
3 REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 1: Caracterização de isolados rizobianos noduladores de feijão fava em solos dos estados do Ceará, Maranhão e Piauí.	24
RESUMO	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 Captura de rizóbios.....	28
2.2 Caracterização Morfológica.....	29
2.3 Caracterização Fisiológica	29
2.4 Caracterização Bioquímica.....	30
2.5 Análise Estatística.....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.2 Caracterização morfológica	33
3.3 Caracterização fisiológica	34
3.4 Caracterização bioquímica	43
4 CONCLUSÕES	49
5 REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE	58
ANEXOS.....	60

RESUMO GERAL

MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM. **Caracterização de isolados rizobianos noduladores de feijão fava em solo dos estados do Ceará, Maranhão e Piauí.** Total de páginas: 61. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

Os rizóbios são bactérias nodulíferas que apresentam grande diversidade filogenética e genética. Podem associar-se a várias leguminosas, entre elas o *Phaseolus lunatus* L. formando estruturas específicas, chamadas nódulos em suas raízes, responsáveis pela fixação do nitrogênio atmosférico, podendo assim contribuir para um melhor desenvolvimento da planta. Objetivou-se caracterizar a partir de uma abordagem polifásica, a diversidade genética de isolados rizobianos nativos noduladores do *P. lunatus* L. coletados em solos dos estados do Ceará, Piauí e Maranhão. Os genótipos de feijão-fava 491 (Boca de Moça) e 468 (Fava Miúda), foram utilizados como planta isca para captura dos isolados, em amostras de solos coletadas de regiões produtoras da cultura nos municípios de Tianguá - CE, Várzea Grande – PI e São Domingos do Maranhão - MA. Foram obtidos 155 isolados, sendo 49 do CE, 45 do PI e 61 do MA, dos quais após realização de coloração de Gram, 75 isolados (17 – CE, 17 – PI, 41 - MA) foram classificados como bastonetes Gram-negativos e caracterizados morfofisiológica e bioquimicamente. Foram realizados os testes bioquímicos de urease, protease, amilase, lipase, carboximetilcelulase (CMC), catalase, gelatinase, solubilização de fosfato e produção de ácido indol-3- acético (AIA). Os resultados identificaram a presença de diversidade morfofisiológica entre os rizóbios noduladores de feijão-fava dos três estados, com maior variação quanto a produção de muco e detalhes ópticos. Os isolados CE06, CE19, CE32, CE36, CE40, CE43, CE49, CE52 do Ceará, PI04, PI08, PI10, PI11, PI12, PI26 do Piauí e MA17, MA25, MA28, MA31, MA55, MA62 do Maranhão reuniram o maior número de resultados positivos em relação aos nove testes avaliados. As análises filogenéticas foram eficientes na diferenciação dos isolados noduladores de feijão-fava encontrados em solos do CE, PI e MA.

Palavras chave: *Phaseolus lunatus* L., diversidade filogenética, bactérias promotoras de crescimento.

ABSTRACT

MARINEIDE RODRIGUES DO AMORIM. **Characterization of rhizobial isolates of bean bean in soil from the states of Ceará, Maranhão and Piauí.** Total pages: 61 Federal University of Piauí, Teresina, 2019.

Rhizobia are nodulating bacteria that present great phylogenetic and genetic diversity. These bacteria can associate with several leguminous plants, among them *Phaseolus lunatus* L. forms specific structures, called nodules in their roots, responsible for the N fixation, thus contributing to a better plant development. The objective of this study was to characterize the genetic diversity of native rhizobial isolates from *P. lunatus* L. in soils of Ceará, Piauí and Maranhão states, Brazil, by using a polyphasic approach. The genotypes UFPI 491 (Boca de Moça) and UFPI 468 (Fava Miúda) were used as trap plants for rhizobia in soil samples collected at Tianguá - CE, Várzea Grande – PI and São Domingos do Maranhão - MA. A total of 155 isolates were obtained, 49 from Ceara, 45 from Piaui, and 61 from Maranhao states, which after Gram staining, 75 isolates were classified as Gram-negative, and, then morphophysiological and biochemically characterized. Tests of urease, protease, amylase, lipase, carboxymethylcellulase (CMC), catalase, gelatinase, phosphate solubilization and indole-3-acetic acid (AIA) production were performed. The results identified the presence of morphophysiological diversity among the lima bean nodulating rhizobia of the three states, with greater variation in mucus production and optical details. The isolates CE06, CE19, CE36, CE40, CE43, CE49, CE52 from Ceará, PI04, PI08, PI10, PI11, PI12, PI12, PI26 from Piauí and MA17, MA25, MA28, MA31, MA55, MA62 from Maranhão presented positive results in relation to the nine evaluated tests. Phylogenetic analyzes were efficient in the differentiation of the isolates found in soils of Ceara, Piaui and Maranhao.

Keywords: *Phaseolus lunatus*, phylogenetic diversity, growth promoting bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 17 isolados bacterianos associados ao Feijão-fava cultivado em solos de Tianguá - CE. 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 52%.
..... 38

Figura 2. Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 17 isolados bacterianos associados ao Feijão-fava cultivado em solos de Várzea Grande - PI. 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 48%.
..... 40

Figura 3. Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 41 isolados bacterianos associados ao Feijão-fava cultivado em solos de São Domingos do Maranhão – MA. 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 52%.
..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades químicas dos solos coletados em Tianguá- CE, Várzea Grande – PI e São Domingos do Maranhão – MA. 28

Tabela 2. Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios noduladores de feijão-fava, oriundos de solo de Tianguá – CE, Várzea Grande – PI, São Domingos do Maranhão- MA. 31

Tabela 3. Grupos de isolados noduladores do feijão-fava cultivados em solos de Tianguá – CE, Várzea Grande – PI e São Domingos do Maranhão - MA, estabelecidos pelo método de Tocher, com 'base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas. 36

Tabela 4. Número de isolados bacterianos coletados em solos de Tianguá – CE, Várzea Grande - PI e São Domingos do Maranhão - MA, usados como inóculo de feijão-fava que apresentaram respostas positivas aos testes bioquímicos..... 44

1 INTRODUÇÃO

Phaseolus lunatus L., conhecido popularmente como feijão-fava é uma leguminosa da família Fabaceae que tem origem Mesoamericana e Andina. Possui boa adaptação e distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, sendo cultivada nas Américas do norte e sul, Europa, África e Ásia. Das duas variedades botânicas existentes (*P. lunatus* var *silvester* e *P. lunatus* var *lunatus*), a *lunatus* é a mais utilizada e inclui os subgrupos “Batata”, “Sieva” e “Lima grande”.

Espécie de importância do gênero *Phaseolus*, possui boa adaptação a condições ambientais adversas e potencial de produção, alto valor nutricional e econômico. Os grãos são fontes de proteína para a alimentação humana e animal e a biomassa vegetal pode ser utilizada como adubo verde ou cultura de cobertura aumentando a proteção e fertilidade dos solos agrícolas.

A cultura destaca-se no Nordeste brasileiro como alternativa alimentar e, embora importante, possui baixa produtividade. Uma das principais razões para essa produtividade é a falta de cultivares e a baixa fertilidade natural dos solos tropicais, principalmente em nitrogênio (N). Entretanto, o *P. lunatus* possui a capacidade de associar-se com bactérias fixadoras de N e, desta forma, absorver o elemento através da fixação biológica do nitrogênio (FBN). O processo de FBN em leguminosas é realizado por bactérias diazotróficas do solo comumente conhecidas por rizóbios.

A FBN em *P. lunatus* é muito variável e a eficiência depende de fatores genéticos da planta e da bactéria. Durante a simbiose, a planta libera exsudados pelas raízes, entre eles os flavonóides que são essenciais na nodulação e que ativam a expressão dos genes, os quais são responsáveis por disparar as sequências de eventos que constituem na formação do nódulo e subsequente fixação de nitrogênio.

Os rizóbios podem interagir com hospedeiros específicos ou com diversas espécies de leguminosas, dentre elas o *P. lunatus* L. O conhecimento sobre a diversidade e distribuição de bactérias noduladoras nessa espécie em áreas produtoras de *P. lunatus* L. no Brasil, e em especial na região Nordeste são escassos. Neste sentido, é importante avaliar a diversidade de bactérias noduladoras desta leguminosa afim de selecionar estirpes de rizóbios

competentes na formação de nódulos, eficientes na FBN e que sejam resistentes as condições de estresses ambientais. As diferentes características fenotípicas e genotípicas que essas bactérias possuem, podem ser diferenciadas em futuros programas de seleção de rizóbios.

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi estimar a diversidade genética de isolados rizobianos nativos noduladores do *P. lunatus* L. coletados em solos dos estados do Ceará, Maranhão e Piauí.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Phaseolus lunatus* L.

As leguminosas do gênero *Phaseolus* possuem importância econômica no mundo. Este gênero é formado por cinco espécies cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman (Duran et al., 2014), onde *P. lunatus* L. é uma espécie de importância socioeconômica (Matsubara e Zuninga D'avila, 2015; Li et al., 2015; Costa et al., 2017b).

O *P. lunatus* L., conhecido no Brasil como feijão-fava ou fava é uma espécie com grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, com tolerância à seca, excesso de umidade e ao calor, caracterizando-se por elevada diversidade genética e potencial de produção (Vieira, 1992; Oliveira et al., 2014).

A espécie *P. lunatus* é constituída de três subgrupos: 1) Sieva, com sementes de tamanho médio e plano; 2) Batata, com sementes pequenas e globulares; e 3) Grande lima, com sementes grandes e planas (Silva et al., 2017). As sementes dessa espécie possuem alto valor nutricional, sendo constituídas de proteínas, carboidratos, vitaminas, aminoácidos, minerais e fibras. Os grãos são consumidos na forma verde, seca ou como vagem, sendo utilizados nas mais diferentes culinárias pelo mundo (Vieira, 1992, Santos et al., 2002).

No Brasil, embora seja cultivada em todos os estados e possua maior capacidade de adaptação que o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o cultivo do feijão-fava ainda é limitado. Isto ocorre, devido à inexistência de cultivares comerciais para fins de produção em grande escala, o que dificulta a aquisição de sementes (Rocha, 2018). A região Nordeste concentra a maior produtividade dessa leguminosa, onde possui importância socioeconômica, sendo utilizada como fonte alternativa de alimento e renda (Silva et al., 2015). A produção é realizada em áreas de pequenos produtores familiares, em consórcio com milho, mandioca, ou mamona (Silva, 2015), sem a adição de tecnologia, como o uso de genótipos que visem o aumento de produtividade, o que gera baixo rendimento (Santos et al., 2002).

O *P. lunatus* L., assim como as demais espécies do gênero, possui capacidade de associar-se simbioticamente com bactérias denominadas rizóbios e, desta forma, absorver N através da FBN (Lira Junior et al., 2015). O

feijão-fava para produzir 1,5 t ha⁻¹ de grãos necessita de aproximadamente 100 kg N (Lopes et al., 2015). Com isso, o primeiro passo para o sucesso do cultivo dessa leguminosa é a seleção de isolados de rizóbios simbiotes eficientes no fornecimento do nutriente para a cultura (Costa et al., 2017b).

2.2 A simbiose rizóbio- *Phaseolus lunatus* L.

Os rizóbios são um grupo especial de bactérias do solo, do tipo gram-negativas e aeróbias obrigatórias, capazes de induzir e invadir os tecidos de raízes e caules formando com as leguminosas uma interação complexa em que ambas obtêm benefício nutricional (Rajwar et al., 2013, Nocelli et al., 2016).

A estrutura simbiote formada dessa associação é conhecida como nódulo, no qual os rizóbios exercem funções essenciais na interação com as plantas (Baginsky et al., 2015, Zeng et al., 2016). Esses microrganismos atuam no processo de FBN contribuindo para a nutrição nitrogenada das leguminosas e melhorando a fertilidade do solo (Moreira et al., 2010; Figueiredo et al., 2013; Agrawal e Shukla, 2016).

Os rizóbios formadores de nódulos em leguminosas possuem ampla diversidade morfológica, fisiológica, bioquímica, genética e filogenética (Orrell e Bennett, 2013; Masson- Boivin e Sachs, 2018). Existem em torno de 15 gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio, distribuídas em mais de 113 espécies conhecidas. Os gêneros simbiotes são *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Herbaspirillum*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella* e *Sinorhizobium* (Chidebe et al., 2017).

As pesquisas de FBN com o gênero *Phaseolus* tem concentrado-se na espécie de *P. vulgaris*, onde já existem estirpes de rizóbios recomendáveis para uso comercial. No entanto, há poucos trabalhos sobre a FBN em *P. lunatus*, o que torna necessário ampliar os estudos sobre essa cultura (Costa et al., 2017a). No Brasil, por exemplo, ainda não há isolados com potencial para serem selecionadas como inoculantes para a cultura de *P. Lunatus* (Antunes et al., 2011). Em um dos estudos relacionados a eficiência de isolados de rizóbios em *P. lunatus*, Costa et al., (2017a), utilizaram estirpes

isoladas de nódulos de *Vigna unguiculata* (UFLA 03-144 e UFLA 03-84), *Campsiandra surinamensis* (INPA 104A), *Inga* sp. (INPA 54B) e *Swartzia* sp. (INPA 86A) em solos da Amazônia para inocular com feijão-fava. Os resultados mostraram isolados eficientes na fixação de nitrogênio tanto em condições axênicas quanto em vasos de Leonard.

2.3 Diversidade de rizóbios associados ao *Phaseolus lunatus* L.

Os estudos de diversidade de rizóbios estão relacionados a vários gêneros de leguminosas tais como *Phaseolus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Trifolium*, *Glicina*. (Santos et al., 2008). Estes estudos se baseiam no conceito polifásico, que aborda as características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. A análise polifásica é uma ferramenta para estimar a diversidade dessas bactérias no solo, além de facilitar a compreensão da biologia e evolução da sua simbiose com leguminosas (Straliozzo, 2010).

Os primeiros estudos demonstraram que o principal simbiote para o feijão-fava nos centros de diversidade dessa leguminosa é *Bradyrhizobium* (Ormeño-Orrillo et al., 2006; López-López et al., 2013). Estudos posteriores descrevem que o *P. lunatus* se associa a bactérias do gênero *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Durán et al., 2014; Araújo et al., 2015).

Allen e Allen (1939) utilizando a caracterização morfofisiológica e bioquímica verificaram que os rizóbios possuem variação na habilidade de nodular determinadas espécies de leguminosas, dentre elas, o *Phaseolus lunatus* que exibiu baixa capacidade de produção de nódulos. Thies et al., (1991) ao analisarem a capacidade de inoculação de três estirpes de rizóbios eficazes em sete tipos de leguminosas, verificaram que a resposta de inoculação do *P. lunatus* foi dependente da presença de rizóbios nativos nos locais de cultivo.

A habilidade dos rizóbios nativos nodularem *Phaseolus* em solos onde essa leguminosa não é nativa, requer cultivos anteriores da mesma. Araújo et al., (2017), ao avaliarem a capacidade de nodulação de diferentes genótipos de *P. lunatus* em solos da Califórnia: previamente plantados com *P. lunatus*, com histórico de plantio de outros tipos de leguminosas, exceto *P. lunatus* e sem plantio de leguminosas, constataram que solos que não possuíam

plantios anteriores de *P. lunatus* não continham rizóbios nativos ou introduzidos, capazes de nodular múltiplos genótipos dessa leguminosa.

A maioria dos estudos relacionados ao feijão-fava ainda são limitados ao Peru e México (Ormeño-Orrillo et al., 2006; López-López et al., 2013; Durán et al., 2014; Matsubara e Zuninga D'ávila, 2015). No Peru, o primeiro estudo relacionado a diversidade de rizóbios em feijão-fava foi conduzido por Ormeño-Orrillo et al., (2006), através de análises morfofisiológicas e filogenéticas. Neste estudo o principal gênero nodulante dessa leguminosa foi o *Bradyrhizobium*. As análises filogenéticas utilizando os genes *nifH* e *nodB* evidenciaram que os isolados estão distribuídos em três clados distintos dentro do gênero *Bradyrhizobium*. Posteriormente, Ormeno et al., (2007), ao conduzirem novos estudos observaram a presença de espécies noduladoras do gênero *Rhizobium* e *Sinorhizobium* no mesmo local anteriormente analisado.

Os primeiros relatos sobre bactérias noduladoras de feijão-fava em seu sítio de domesticação mesoamericano (México) foram realizados por Lopez-Lopez et al., (2013). A partir das análises genéticas usando ERIC-PCR e PCR-RFLP de genes *rpoB* e sequenciamento dos genes *recA*, *nodZ* e *nifH* verificou-se que uma diversidade de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* relacionados com os rizóbios nativos da floresta de Tuxtla na América do Norte estão associados com *P. lunatus* e *Vigna unguiculata*. As populações bradirrizóbicas associadas a *P. lunatus* e *V. unguiculata* foram diferentes e apenas um padrão PCR-RFLP *rpoB* foi compartilhado. As genoespécies associadas a *P. lunatus* foram TUXTLAS-17, TUXTLAS-4, TUXTLAS-20 e TUXTLAS-2, três novas genoespécies (TUXTLAS-33, -34 e -35) e *Bradyrhizobium japonicum*.

No Peru, Duran et al., (2014), usando uma abordagem polifásica que combinava critérios genotípicos, fenotípicos e genômicos, analisaram estirpes de uma nova linhagem de *Bradyrhizobium* como simbiontes de feijão-fava. As evidências alcançadas no estudo indicaram que os dois clados analisados correspondiam a um grupo genômico homogêneo que poderia ser comparado como espécies distintas dentro do gênero *Bradyrhizobium*, as quais denominaram *B. paxllaeri* sp. nov. e *B. icense* sp. nov.

Em seguida, Matsubara e Zuninga D'ávila (2015), caracterizam isolados bacterianos de nódulos radiculares de *P. lunatus* L. cultivados no super Vale do Peru. As análises indicaram que as estirpes estão distribuídas entre as espécies

B. yuanyrense, *B. liaoningense*, *B. paxllaeri*, *B. icense*, *R. mesosinicum*, *R. alamii*. Os resultados obtidos destacam que as diferenças fenotípicas dos isolados noduladores de *P. lunatus* podem ser utilizados como ferramentas para a seleção de bactérias com potencial biofertilizante.

No Brasil, os estudos de diversidade de rizóbios em feijão-fava ainda são escassos. O primeiro estudo com diversidade de rizóbio foi realizado por Santos et al., (2011) que caracterizaram rizóbios noduladores de feijão-fava cultivados em solo do estado do Piauí. As análises de caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica exibiram alta diversidade dos isolados, sugerindo que eles estavam sujeitos a diferentes pressões ambientais seletivas. As principais características exibidas pelos isolados, tais como crescimento rápido ou intermediário permitiram identifica-los como espécies dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*.

Posteriormente, Antunes et al., (2011), avaliaram a eficiência simbiótica de rizóbios nativos de duas regiões produtoras de feijão-fava no Piauí. Os isolados utilizados no estudo haviam sido classificados morfológica e fisiologicamente por Santos et al., (2011). Alguns isolados apresentaram maior acumulação e eficiência na fixação de N em relação as estirpes de referência. Esses resultados indicam que esses isolados possuem potencial para serem usados como inoculantes.

Várias estirpes do gênero *Bradyrhizobium* já foram documentadas em diferentes genótipos de feijão-fava (Santos et al., 2011; Araújo et al., 2015) no Brasil. As estirpes podem apresentar ou não especificidade na capacidade de realizar simbiose. No caso dos *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, que são frequentes em processos simbióticos na América Central e do Sul, o nível de eficiência desses simbiontes é baixo em comparação ao *Bradyrhizobium* (Araújo et al., 2015; Costa Neto et al., 2017).

Pesquisas realizadas por Araújo et al., (2015), encontraram rizóbios associados a *P. lunatus* diferentes daqueles encontrados por Ormeno-Orrillo et al., (2006), em solos do Peru. Eles realizaram estudos onde os genótipos de *P. lunatus* foram cultivados em solos originários do Nordeste brasileiro. Os 14 isolados obtidos foram submetidos a análise genética utilizando o gene 16S rRNA. Verificou-se diversidade de espécies, onde os isolados foram

distribuídos entre o gênero *Allorhizobium* e a maioria entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* com índices de similaridade de 71 e 100% respectivamente.

Em seguida, Costa Neto et al., (2017), avaliaram a eficiência de isolados nativos de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* em associarem-se ao *P. lunatus*. Os resultados relatam que os feijões inoculados com *Bradyrhizobium* possuíam um maior crescimento absoluto e relativo, além de exibirem um maior número de nódulos e nodulação específica em comparação com os inoculados com *Rhizobium*. Isso indica que os nódulos induzidos por *Rhizobium* são menos eficientes na fixação de nitrogênio.

Pereira (2018), identificou e caracterizou, a partir de uma abordagem polifásica, isolados bacterianos de feijão-fava no Piauí. Com base no gene 16S rRNA foram identificados nove gêneros bacterianos: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Williamsia* e *Bradyrhizobium*. Essas bactérias estão distribuídas entre as indutoras de nodulação e fixadoras de nitrogênio e as endofíticas, dentre as quais as que atuam como bactérias promotoras de crescimento. *Bradyrhizobium*, revelou-se o mais abundante e *Rhizobium* e *Burkholderia*, são considerados em geral como indutores de nodulação e fixadores de nitrogênio.

Os trabalhos descritos anteriormente indicam que o Nordeste possui alta diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (Nascimento, 2014), no entanto, os estudos sobre a diversidade e distribuição dessas bactérias noduladoras de feijão-fava concentra-se em solos do estado do Piauí e foi iniciado por Santos (2008), que realizou a seleção e avaliação de rizóbios noduladores de feijão-fava.

Pesquisas utilizando uma abordagem polifásica precisam ser realizadas e ampliadas para as demais regiões do Nordeste, a fim de que se aumente o acervo de informações agronômicas sobre o feijão-fava e que se faça a seleção de estirpes eficientes, que possuam habilidade na fixação de nitrogênio, que sejam competentes na formação de nódulos, que tenham a capacidade de permanência no solo resistindo a condições de estresses ambientais (Souza et al., 2016). Essas estirpes podem vir a ser utilizadas como inoculantes, sendo assim uma alternativa para a substituição parcial ou total da adubação nitrogenada (Costa Neto et al., 2017).

3 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.; SHUKLA, S. Diversity of root nodule bacteria from leguminous crops. **Archives of Biological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 195-205, 2016.
- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. Root nodule bacteria of some tropical leguminous plants: II. Cross-inoculation tests within the cowpea group. **Soil Science**, v. 47, n. 1, p. 63-76, 1939.
- ANTUNES, J. E. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, Â. C. A.; ARAÚJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. D. V. B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 751-757, 2011.
- ARAUJO, A. S. F.; LOPES, Â. C. A.; GOMES, R. L. F.; JUNIOR, J. E. A. B.; ANTUNES, J. E. L.; FIGUEIREDO, M. D. V. B. Diversity of native rhizobia-nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume Research-An International Journal**, v. 38, n. 5, p. 653-657, 2015.
- ARAUJO, A. S. F.; LOPES, A. C. A.; Y TERAN, J. C. B. M.; PALKOVIC, A.; GEPTS, P. Nodulation ability in different genotypes of *Phaseolus lunatus* by rhizobia from California agricultural soils. **Symbiosis**, v. 73, n. 1, p. 7-14, 2017.
- BAGINSKY, C.; BRITO, B.; SCHERSON, R.; PERTUZÉ, R.; SEGUEL, O.; CAÑETE, A.; ARANEDA, C.; JOHNSON, W. E. Genetic diversity of *Rhizobium* from nodulating beans grown in a variety of Mediterranean climate soils of Chile. **Archives of microbiology**, v. 197, n. 3, p. 419-429, 2015.
- CHIDEBE, I. N.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) nodules across different agro-ecological regions of Mozambique. **Applied Environment Microbiology**.2017.
- COSTA, E. M.; GUIMARÃES, A. A.; VICENTIN, R. P.; RIBEIRO, P. R. A.; LEÃO, A. C. R.; BALSANELLI, E.; LEBBE, L.; AERTS, M.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F. M. S. *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 8, p. 1211-1221, 2017a.
- COSTA, E. M.; RIBEIRO, P. R. A.; LIMA, W.; FARIAS, T. P.; MOREIRA, F. M. S. Lima bean nodulates efficiently with *Bradyrhizobium* strains isolated from diverse legume species. **Symbiosis**, v. 73, n. 2, p. 125-133, 2017b.
- COSTA NETO, V. P.; MENDES, J. B. S.; ARAÚJO, A. S. F.; ALCÂNTARA NETO, F.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C. Symbiotic performance, nitrogen flux and growth of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) varieties inoculated with different indigenous strains of rhizobia. **Symbiosis**, v. 73, n. 2, p. 117-124, 2017.

DURÁN, D.; REY, L.; MAYO, J.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; ORMEÑO-ORRILLO, E. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2072-2078, 2014.

FIGUEIREDO, M.D.V.B.; SANTO MERGULHÃO, A.C.D.E.; SOBRAL, J.K.; JUNIOR, M.D.A.L.; ARAÚJO, A.S.F. Biological nitrogen fixation: importance, associated diversity, and estimates. In: **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**. Springer, New Delhi, p. 267-289. 2013.

LI, F.; CAO, D.; LIU, Y.; YANG, T.; WANG, G. Transcriptome sequencing of lima bean (*Phaseolus lunatus*) to identify putative positive selection in *Phaseolus* and legumes. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15172-15187, 2015.

LIRA JUNIOR, M.A.; NASCIMENTO, L.R.S., FRACETTO, G.G.M. Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 945, 2015.

LOPES, Â.C.A.; GOMES, R.L.F.; ARAÚJO, A.S.F. **Phaseolus lunatus: Diversity, Growth and Production**. New York: Nova Science Inc. 2015.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; NEGRETE-YANKELEVICH, S.; ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean). **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 1, p. 33-38, 2013.

MASSON-BOIVIN, C.; SACHS, J. L. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. **Current opinion in plant biology**, v. 44, p. 7-15, 2018.

MATSUBARA, M; ZÚÑIGA-DÁVILA, D. Phenotypic and molecular differences among rhizobia that nodulate *Phaseolus lunatus* in the Supe valley in Peru. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1803-1808, 2015.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Diazotrophic associative bacteria: diversity, ecology and potential applications. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010

NASCIMENTO, A.R.L. **Diversidade e caracterização de rizóbios associados ao feijão-fava no semiárido**. Serra Talhada- PE. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 53p. 2014.

NOCELLI, N.; BOGINO, P.C.; BANCHIO, E.; GIORDANO, W. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. **Materials**, v. 9, n. 6, p. 418, 2016.

- OLIVEIRA, A.E.S.; SIMEÃO, M.; MOUSINHO, F.E.P.; GOMES, R.L.F. Desenvolvimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sob déficit hídrico cultivado em ambiente protegido. **Holos**, ano 30. v. 01, 2014.
- ORMEÑO, E.; TORRES, R.; MAYO, J.; RIVAS, R.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E.; ZÚNIGA, D. *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. In: **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**. Springer, Dordrecht, p. 143-147. 2007.
- ORMENO-ORRILLO, E.; VINUESA, P.; ZUNIGA-DAVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 3, p. 253-262, 2006.
- ORRELL, P.; BENNETT, A.E. How can we exploit above–belowground interactions to assist in addressing the challenges of food security? **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 432, 2013.
- PEREIRA, C.S. **Caracterização polifásica de comunidade bacteriana simbiote e endofítica presente em nódulos de feijão-fava. (*Phaseolus lunatus* L.)**. Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Piauí. 62f. 2018
- RAJWAR, A.; SAHGAL, M.; JOHRI, B.N. Legume–rhizobia symbiosis and interactions in agroecosystems. In: **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**. Springer, New Delhi, p. 233-265. 2013.
- ROCHA, S.M.B. **Caracterização de bactérias promotoras de crescimento em plantas isoladas em áreas com lodo de curtume compostado**. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Piauí, Teresina,57p. 2018
- SANTOS, D., CORLETT, F. M. F., MENDES, J. E. M. F., JÚNIOR, J. S. A. W. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1407-1412, 2002.
- SANTOS, J.O. **Divergência genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí, Teresina,97p. 2008.
- SANTOS, J.O.; ARAÚJO, A.S.; GOMES, R.L.; LOPES, A.C.A.; FIGUEIREDO, M.V. Rhizobia *Phaseolus lunatus* Symbiosis: Importance and diversity and tropical soils-a review. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v. 2, n. 2, p. 56-60, 2008.
- 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.
- SILVA, R.N.O. **Estudos genéticos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) Visando o melhoramento genético da cultura**. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes – RJ. 98 p. 2015.

SILVA, R.N.O.; LOBO-BURLE, M.; GOMES-PÁDUA, J.; ALMEIDA-LOPES, A.C.D.; FERREIRA-GOMES, R.L.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Phenotypic diversity in lima bean landraces cultivated in Brazil, using the Ward-MLM strategy. **Chilean journal of agricultural research**, v. 77, n. 1, p. 35-40, 2017.

SILVA, V.B.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A.; DIAS, C.T.S.; SILVA, R.N.O. Genetic diversity and promising crosses indication in lima bean (*Phaseolus lunatus*) accessions. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, 2015.

SOUZA, J.D.S.; RODRIGUES, L.N.; SOUZA, J.T.; SALES, L.D.A., NASCIMENTO, N.F.F. **Caracterização morfoagronômica de feijão fava**. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia CONTECC'2016. Rafain Palace Hotel & Convention Center- Foz do Iguaçu – PR. 2016.

STRALIOTTO, R. **Diversidade do Rizóbio–Evolução dos Estudos Taxonômicos**. Embrapa. Miolo_biota.pmd. **Research Gate**. p-223-255. 2010.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 1, p. 19-28, 1991.

VIEIRA, C. **Leguminosas de grãos: importância econômica na agricultura e na alimentação humana**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte. v.16, n.174, p.5-11, 1992.

ZENG, X.; WU, Q.; CHEN, D.; XIE, F.; LI, Y. Phylogenetic analysis and symbiotic functional characterization of opa22-homologous genes in three rhizobial strains. **European Journal of Soil Biology**, v. 73, p. 15-25, 2016.

CAPÍTULO 1: Caracterização de isolados rizobianos noduladores de feijão fava em solos dos estados do Ceará, Maranhão e Piauí.

RESUMO

Phaseolus lunatus L. conhecido como feijão-fava é uma das cinco espécies do gênero *Phaseolus* que se destacam por sua importância econômica, principalmente na região Nordeste do Brasil. É capaz de associar-se com diversas bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio. O objetivo do trabalho foi caracterizar a diversidade de rizóbios noduladores de feijão-fava cultivados em solos dos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, utilizando caracteres filogenéticos e genéticos. Foram obtidos 155 isolados de nódulos coletados dos genótipos de feijão-fava 491 (Boca de Moça) e 468 (Fava Miúda), cultivados em solos, com histórico de cultivo da cultura, dos municípios de Tianguá – CE, Várzea Grande – PI e São Domingos do Maranhão – MA. Após coloração de Gram, 75 isolados (17–CE, 41- MA, 17-PI) foram classificados como bastonetes Gram-negativos e caracterizados filogeneticamente. Produção de muco e detalhes ópticos foram os caracteres morfofisiológicos mais variáveis entre os isolados analisados. Nos testes bioquímicos (urease, protease, amilase, lipase, carboximetilcelulase, catalase, gelatinase, solubilização de fosfato e produção de ácido indol-3- acético), os isolados CE06, CE32 e CE40 (cinco testes), CE19, CE36, CE43, CE49, CE52 (quatro testes) no Ceará, PI04, PI26 (seis testes), PI8, PI10, PI11, PI12 (cinco testes) no Piauí e MA28 (sete testes), MA17, MA25, MA31, MA55, MA62 (seis testes) no Maranhão, exibiram os melhores resultados em relação a quantidade de testes positivos. A diversidade filogenética verificada entre os isolados, apontam que *P.lunatus* possui pouca especificidade ao associar-se com bactérias do solo.

Palavras chave: bactérias promotoras de crescimento de plantas, *Phaseolus lunatus* L., diversidade filogenético, prospecção de bactérias.

ABSTRACT

CHAPTER 1: Characterization of rhizobial isolates of bean bean in soils from the states of Ceará, Maranhão and Piauí.

Phaseolus lunatus L., known as lima bean, is one of the five species of the genus *Phaseolus* that present economic importance, mainly in the Northeast region of Brazil. It is capable to associate with several diazotrophic N-fixing bacteria. The objective of this work was to characterize the diversity of nodulating rhizobia from lima bean cultivated in soils of the Ceará, Piauí and Maranhão states by using phylogenetic and genetic characteristics. A total of 155 isolates of nodules collected from bean genotypes UFPI 491 (Boca de Moça) and UFPI 468 (Fava Miúda), cultivated in soils with a history of lima bean planting in Tianguá - CE, Várzea Grande - PI and São Domingos do Maranhão - MA. A total of 75 isolates (17-CE, 41-MA, 17-PI) were classified as gram-negative and phylogenetically characterized. Mucus production and optical details were the most identified morphophysiological variable among the isolates. In biochemical tests (urease, protease, amylase, lipase, carboxymethylcellulose, catalase, gelatinase, phosphate solubilization and indole-3 acetic - the isolates CE06, CE32 e CE40 (five tests), CE19, CE36, CE43, CE49, CE52 (four tests) in Ceará, PI04, PI26 (six tests), PI8, PI10, PI11, PI12 (five tests) in Piauí and MA28 (seven tests), MA17, MA25, MA31, MA55, MA62 (six testes) in Maranhão showed the best results in relation to the number of positive tests. The phylogenetic diversity, verified among the isolates, indicates that *P.lunatus* has little specificity when associating with soil bacteria.

Keywords: plant growth promoting bacteria. *Phaseolus lunatus* L., phylogenetic diversity. Prospecting of bacteria

1 INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma das espécies do gênero *Phaseolus* de grande importância socioeconômica especialmente na região Nordeste do Brasil. Cultivado na América do Norte, América do Sul, África, Europa e Ásia é considerada uma espécie muito diversificada, possuindo grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Caracteriza-se por elevada diversidade genética e potencial de produção sendo tolerante à seca, ao excesso de umidade e ao calor.

P. lunatus L., assim como outras leguminosas tem a capacidade de associar-se simbioticamente com bactérias diazotróficas do solo conhecidas como rizóbios. Nessa associação a bactéria fixa o nitrogênio atmosférico disponibilizando-o para a planta hospedeira em estruturas denominadas de nódulos que se desenvolvem nas raízes da leguminosa. O processo de infecção e formação dos nódulos é bastante especializado e depende de fatores genéticos (sinalizadores moleculares) e da interação com fatores edafoclimáticos.

Estudos de caracterização fenotípica e molecular, podem aumentar o conhecimento atual sobre a fisiologia, taxonomia e seleção de bactérias com potencial de adaptação às condições edafoclimáticas de determinada região, além da aplicação biotecnológica destes microrganismos. A abordagem polifásica tem sido um dos métodos mais utilizados na identificação da diversidade genética de rizóbios noduladores de leguminosas do gênero *Phaseolus* como tem sido observado em trabalhos desenvolvidos por Duran et al., 2014; Sampaio et al., 2016; Agrawal e Shukla, 2016; Costa et al., 2018.

No entanto, há poucos estudos sobre a diversidade e distribuição de bactérias noduladoras em *P. lunatus* L. nos seus centros de domesticação. O primeiro estudo sobre diversidade genética de rizóbios em feijão-fava foi conduzida por Ormeno-Orrillo et al., (2006), no qual utilizando a abordagem morfofisiológica identificaram o gênero *Bradyrhizobium*, como nodulador do feijão-fava em solos no Peru. No Brasil, Santos et al., (2011) foi o primeiro a utilizar abordagem morfofisiológica para caracterizar rizóbios noduladores do *P. lunatus* em solos no estado do Piauí, onde identificou os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*.

Esses resultados demonstram que o *P. lunatus* apresenta um nível de especificidade limitado. Dessa forma, objetivou-se caracterizar a partir de uma abordagem polifásica, a diversidade genética de isolados rizobianos nativos noduladores do *P. lunatus* L. coletados em solos dos estados do Ceará, Piauí e Maranhão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Captura de rizóbios

A primeira etapa do estudo, foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias-UFPI, Piauí, Brasil (05°05'21" S e 42°48'07" W) entre abril e julho de 2017, onde foram utilizadas amostras de solo compostas de quatro pontos distintos de cada área em estudo, e posteriormente submetidas as análises das propriedades químicas (Tabela 1). As amostras que possuíam histórico de cultivo de feijão-fava foram coletadas nos municípios de Tianguá – Ceará (03° 43' 56" S; 40° 59' 30" W), Várzea Grande - Piauí (06° 32' 41" S; 42° 14' 47" W) e São Domingos do Maranhão - Maranhão (5° 34' 46" S, 44° 22' 59" W).

Tabela 1. Propriedades químicas dos solos coletados em Tianguá- CE, Várzea Grande – PI e São Domingos do Maranhão – MA.

ESTADOS	pH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al
	H ₂ O	mg.dm ⁻³						
Ceará	4,90	0,72	0,03	0,00	1,21	0,50	0,50	3,21
Piauí	6,10	1,69	0,26	0,00	2,65	0,81	0,00	2,03
Maranhão	5,50	2,83	0,05	0,00	1,70	0,40	0,30	4,90

Em cada localidade coletou-se 15kg de solo, que foram distribuídos em três vasos com capacidade de 5kg cada. Foram plantados, por vaso, oito sementes de dois genótipos de feijão-fava: quatro de 491 (Boca de Moça) e quatro de 468 (Fava Miúda), oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de feijão-fava (BAG de feijão-fava) da UFPI. Após sete dias do plantio, realizou-se o desbaste, restando duas plantas por vaso, sendo uma de cada genótipo.

Durante o plantio realizou-se adubação mineral isenta de N e correções de pH do solo conforme as recomendações técnicas para a cultura (Bezerra et al., 2010). Duas vezes por semana foi colocado 2ml da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada conforme Silveira et al., (1998) por kg de solo isenta de nitrogênio. A umidade do solo foi mantida próximo à 70% da capacidade de vaso com a aplicação de água potável.

As plantas foram colhidas aos 34 dias após a emergência, onde coletou-se todos os nódulos, que depois de lavados em água corrente foram armazenados

em tubos contendo sílica gel. Para proceder com o isolamento dos rizóbios, os nódulos foram reidratados em água destilada autoclavada por 12 horas, posteriormente esterilizados com álcool 95% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por 2 min e lavado cinco vezes em água destilada autoclavada (Hungria,1994). Após a desinfestação, os três maiores nódulos de cada genótipo das localidades acima citadas foram macerados em solução salina a 0,85% de NaCl.

Posteriormente, 200µl do macerado foram colocados em placa de Petri em triplicata contendo o meio de extrato de levedura-manitol-ágar - YMA (Vicent, 1970) com o reagente Vermelho Congo 0,025% (v/v) como indicador de pureza, de acordo com a metodologia descrita por Hungria (1994). Após a inoculação, as colônias isoladas que não absorveram o reagente e que haviam crescido entre 2 a 10 dias foram inoculadas novamente em meio de cultura YMA com vermelho congo até a verificação da pureza da colônia. Após a purificação foram repicadas para meio YMA sem indicador, armazenadas em 4°C e posteriormente analisados morfológica, fisiológica e bioquimicamente utilizando-se o questionário elaborado por Hungria e Silva (2011) com modificações (Anexo 1).

2.2 Caracterização Morfológica

A caracterização microbiológica inicial dos isolados foi realizada através da observação das características morfológicas das colônias crescidas em meio sólido YMA com o indicador, ácido-básico, azul de bromotimol (Vicent, 1970) em placas de Petri. Os isolados foram identificados em estereomicroscópio (180x), onde observou-se as seguintes variáveis : **Forma da colônia**- punctiforme (até 1 mm de diâmetro); circular (com mais de 1 mm de diâmetro); irregular; filamentosa; **Elevação da colônia** – plana, lenticular, convexa, pulvinada; **Bordas da colônia** - inteiros, ondulados, lobados, denteada, filamentosa; **Superfície da colônia** - lisa, rugosa, papilada; **Caracteres ópticos da colônia** - opaca, translúcida e transparente (Melloni et al., 2006) (Anexo 1).

2.3 Caracterização Fisiológica

Em relação aos caracteres fisiológicos, os isolados foram avaliados em meio YMA com indicador azul de bromotimol observando-se as variáveis: **tempo de crescimento** (TC: MR- muito rápido, 1 dia, R - rápido, 2 a 3 dias, I – intermediário - 4 a 5 dias, L- lento- 6 a 15 dias) (Martins et al., 1997); **formação de ácidos e álcalis** (FAA: AC - ácida, N- neutra, AL - alcalina), **formação de muco** (FM: A - ausente, P - presente); **volume do muco** (VM: UM - muito, M - médio, P - pouco e S - seco) **elasticidade do muco** (EM: P - presença de fio, A - ausência de fio), **Cromogenia ou Pigmentação da colônia** - amarela, branca, creme, incolor (Melloni et al., 2006) (Anexo 1).

2.4 Caracterização Bioquímica

Os isolados passaram por nove tipos de testes bioquímicos: degradação da carboxil-metil-celulose (CMC) (Dees et al., 1995), produção de protease, urease, amilase, lipase (Renwick et al., 1991), solubilização de fosfato (NBRIP) (Nautiyal 1999; Verma et al., 2001), onde foram observados a presença ou ausência de halo em torno das colônias, a produção de catalase (Agrawal e Jain, 2009) pela presença ou ausência de bolhas de O₂, produção de ácido indol-3- acético (AIA) (Sarwar e Kremer, 1995) pela coloração rósea em meio líquido e reação de gelatinase (Singh et al., 2008) presença de amostras no estado líquido após refrigeração. Foi realizada ainda a coloração de Gram (Yano et al., 1991) que serviu de variável de identificação dos isolados em bactérias Gram positivas ou negativas (Anexo 1).

2.5 Análise Estatística

Na análise de divergência genética entre os isolados bacterianos noduladores de feijão-fava cultivados em solos de Tianguá – CE, Várzea Grande –PI e São Domingos do Maranhão - MA, utilizou-se a moda dos dados referentes às características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para obter-se a matriz de dissimilaridade, que posteriormente foi submetida às técnicas de análises multivariadas: método de Tocher e método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O corte no dendrograma gerado pelo método UPGMA foi realizado no ponto em que se observou a

mudança abrupta de nível, conforme recomendado por Cruz et al., (2004). As análises do dendrograma foram realizadas com auxílio do programa GENES (Cruz, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do processo de isolamento foram obtidos e identificados 115 bactérias extraídas de nódulos de *Phaseolus lunatus* L., distribuídos entre 49 isolados de Tianguá – CE, 45 de Várzea Grande – PI e 61 de São Domingos do Maranhão –MA. Após realizar a coloração de Gram, 17 isolados do Ceará, 17 do Piauí e 41 do Maranhão foram classificados como bactérias Gram-negativas do tipo bastonetes e caracterizados a partir de análises morfofisiológicas (Tabela 2), e bioquímicas (Apêndice 1, 2, 3).

Tabela 2. Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios noduladores de feijão-fava, oriundos de solo de Tianguá – CE, Várzea Grande – PI, São Domingos do Maranhão- MA.

Isolados	Características morfológicas 1					Características fisiológicas 2				
	FC	EC	BC	SC	DO	TC	pH	PM	TM	CC
CE02	CI	CV	IT	LS	OP	RP	AC	MD	GM	CR
CE03	CI	CV	OD	LS	OP	RP	NE	PC	VC	CR
CE06	CI	CV	OD	LS	TL	RP	AC	MD	GM	AM
CE10	EL	CV	IT	LS	OP	RP	AC	MD	GM	CR
CE15	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
CE17	IR	CV	OD	LS	OP	RP	AC	MD	GM	CR
CE18	CI	CV	IT	LS	OP	RP	NE	MD	GM	CR
CE19	CI	CV	IT	LS	TL	RP	NE	MD	GM	CR
CE27	EL	PL	IT	LS	TL	RP	AC	PC	GM	CR
CE32	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	VC	CR
CE34	CI	CV	IT	LS	OP	RP	AC	AD	GM	AM
CE36	CI	CV	IT	LS	OP	RP	NE	MD	GM	CR
CE40	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
CE43	CI	PL	IT	RG	OP	RP	AC	EC	VC	IN
CE48	CI	CV	IT	RG	OP	RP	AC	PC	GM	AM
CE49	CI	CV	OD	LS	TL	RP	NE	MD	GM	CR
CE52	CI	CV	IT	LS	TL	RP	NE	MD	GM	CR
PI02	EL	CV	OD	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
PI03	CI	CV	IT	RG	OP	RP	AC	PC	GM	CR
PI04	CI	CV	OD	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
PI08	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	VC	CR
PI09	IR	PL	OD	RG	OP	RP	AC	MD	GM	AM
PI10	CI	PL	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR

Isolados	Características morfológicas 1					Características fisiológicas 2				
	FC	EC	BC	SC	DO	TC	pH	PM	TM	CC
PI11	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	AD	GM	AM
PI12	CI	CV	IT	RG	TL	RP	AC	PC	GM	CR
PI13	EL	CV	OD	LS	OP	RP	AC	PC	VC	CR
PI17	IR	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
PI18	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
PI21	EL	CV	IT	LS	TL	RP	AC	AD	VC	AM
PI25	IR	PL	OD	LS	TL	RP	AC	MD	VC	CR
PI26	IR	CV	IT	LS	TP	RP	NE	EC	SC	IN
PI40	CI	PL	IT	RG	OP	RP	AC	PC	GM	CR
PI45	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	AM
PI49	CI	PL	OD	LS	OP	RP	NE	PC	GM	CR
MA01	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	AD	VC	AM
MA03	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	AM
MA06	CI	CV	IT	LS	OP	RP	AC	MD	GM	AM
MA07	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	AD	GM	AM
MA08	EL	CV	IT	LS	TL	RP	NE	MD	GM	CR
MA11	CI	CV	IT	LS	OP	RP	AC	AD	GM	AM
MA12	CI	PL	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
MA13	EL	CV	IT	LS	OP	RP	AC	PC	GM	CR
MA14	CI	PL	OD	LS	OP	RP	AC	PC	GM	AM
MA15	IR	CV	OD	RG	OP	RP	AC	PC	GM	AM
MA17	CI	PL	IT	LS	TL	RP	AC	EC	SC	CR
MA18	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	VC	CR
MA20	CI	PL	IT	LS	OP	RP	AC	PC	GM	CR
MA21	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
MA22	CI	PL	IT	LS	TL	RP	AC	EC	SC	CR
MA25	CI	CV	IT	LS	OP	RP	AC	PC	GM	AM
MA27	CI	CV	IT	RG	OP	RP	AC	MD	VC	CR
MA28	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	AD	VC	CR
MA29	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	AD	GM	AM
MA31	CI	CV	IT	LS	OP	RP	AC	MD	GM	CR
MA32	CI	PL	IT	LS	OP	RP	NE	EC	SC	CR
MA33	IR	PL	OD	LS	OP	RP	AC	MD	GM	CR
MA34	IR	PL	IT	RG	OP	RP	AC	MD	GM	CR
MA36	CI	CV	IT	RG	OP	RP	AC	AD	GM	CR
MA37	CI	PL	IT	RG	TL	RP	AC	MD	GM	CR
MA39	CI	CV	IT	RG	OP	RP	AC	MD	VC	CR
MA41	CI	PL	IT	LS	OP	RP	AC	PC	GM	CR
MA42	IR	PL	OD	RG	TL	RP	AC	EC	SC	CR
MA45	CI	PL	IT	RG	OP	RP	AC	MD	GM	CR
MA46	IR	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	VC	AM
MA48	CI	CV	OD	LS	OP	RP	AC	MD	GM	CR
MA49	CI	PL	IT	LS	OP	RP	AC	PC	GM	CR
MA51	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
MA52	CI	PL	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	AM
MA53	CI	PL	OD	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR
MA54	CI	CV	OD	LS	TL	RP	AC	AD	VC	CR
MA55	CI	CV	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR

Isolados	Características morfológicas 1					Características fisiológicas 2				
	FC	EC	BC	SC	DO	TC	pH	PM	TM	CC
MA56	IR	CV	OD	LS	TL	RP	AC	MD	GM	AM
MA59	CI	PL	IT	RG	OP	RP	AC	MD	GM	AM
MA61	IR	CV	IT	LS	OP	RP	AC	MD	GM	CR
MA62	IR	PL	IT	LS	TL	RP	AC	MD	GM	CR

¹Morfológicas: FC - forma (CI: circular, IR: irregular, EL: elipsóide); EC - elevação (CV: convexa, PL: plana); BC - borda (IT: inteira, OD: ondulada); SC- superfície (LS: lisa, RG: rugosa); DO- detalhes ópticos (TL: translúcida, OP: opaco) ²Fisiológicas: TC - tempo de crescimento (RP: rápido); pH- formação de ácido e álcalis (AC: ácida, NE: neutro); PM- produção de muco (AD: abundante, MD: moderada; PC: pouco; EC: escassa), TM - consistência do muco (GM: gomosa ; VC: viscosa (elástica); SC: seca), CC- cor (CR: creme, AM: amarelo).

3.2 Caracterização morfológica

A maioria dos isolados dos três estados exibiram colônias circulares, convexas, com bordas inteiras e de superfície lisa. Em relação aos detalhes ópticos, colônias opacas foram mais frequentes entre os isolados do Ceará, enquanto que nos do Piauí e Maranhão predominou colônias translúcidas. As análises morfológicas indicaram a presença de diversidade entre os rizóbios noduladores do feijão-fava nos solos do Ceará, Piauí e Maranhão (Tabela 2).

Os solos exercem grande influência sobre os tipos e a distribuição de comunidades microbianas na rizosfera (Marschner et al., 2004), uma vez que diferenças na composição química e localização geográfica exercem diferentes pressões ambientais seletivas nas características fenotípicas dos isolados. Os rizóbios usualmente são formados por colônias de bordas lisas, opacas ou translúcidas e as vezes, muito gomosas evidenciando elevada produção de exopolissacarídeos (Kaschuk e Hungria, 2017). Resultados semelhantes foram verificados entre a maioria dos isolados coletados dos solos dos três estados em estudo.

Silva et al., (2007), ao caracterizar morfofisiologicamente isolados rizobianos noduladores de feijão-caupi de solos nativos da região semi-árida de Pernambuco e Costa et al., (2017) ao caracterizar por abordagem polifásica rizóbios microsimbiontes de feijão comum no Mato Grosso do Sul obtiveram diferentes grupos de rizóbios. Estes resultados confirmam a diversidade morfofisiológica observada em rizóbios em diferentes regiões, além de reforçar o

conceito de que eles podem associar-se com diferentes espécies de leguminosas.

3.3 Caracterização fisiológica

Levando em consideração os critérios de classificação quanto ao tempo de crescimento, todos os isolados identificados dos três estados exibiram crescimento rápido, variando de 24 a 72 horas. O crescimento rápido favorece uma maior sobrevivência no solo, pois os isolados podem estar mais adaptados as condições edafoclimáticas da região (Santos et al., 2011) (Tabela 2).

Santos et al., (2007), afirmam que o crescimento rápido de rizóbios constitui uma estratégia de sobrevivência em regiões áridas, tornando-os mais tolerantes a secas e capazes de se multiplicarem mais rapidamente nos intervalos de tempos úmidos do que os de crescimento lento, o que explica sua maior frequência em solos de regiões semiárida, como é o caso dos estados avaliados nesse estudo. Dentre os gêneros que possuem crescimento rápido podem ser citados *Rhizobium* (Hungria et al., 2016) e *Sinorhizobium* (Matsubara e Zúñiga-Dávila, 2015). Esses resultados contrastam com o conhecimento corrente de que os rizóbios que nodulam o feijão-fava pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* (López-López et al., 2013; Araújo et al., 2015; Costa Neto et al., 2017).

Quanto à produção de ácido e álcalis, produção de muco, consistência do muco e cor da colônia, os isolados dos três estados em sua maioria tiveram reação ácida tornando o meio amarelo, possuem a habilidade moderada de produzir muco, cuja consistência é gomosa e exibiram colônias de coloração creme. Segundo Sankhla et al., (2015), a reação acida ou neutra no meio YMA é característico de rizóbios de crescimento rápido.

Rizóbios que acidificam o meio e possuem elevada produção de muco caracterizam-se por multiplicarem-se mais rapidamente e apresentarem maior tolerância à seca (Almeida et al., 2018; Rodrigues et al., 2018), características estas verificadas entre os isolados coletados em solos dos estados do Ceará, Piauí e Maranhão. A sua produção pode ser aumentada pela limitação de nutrientes disponíveis como fósforo e cálcio (Bomfeti et al., 2011).

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 mais resistentes a microrganismos produtores de antibióticos, devido a produção de muco ocasionar alteração da permeabilidade das células (Medeiros et al., 2009). Embora colônias de cor amarela tenham sido citadas como incomum por Hungria (1994), essa coloração tem sido frequentemente encontradas em trabalhos com solos do Nordeste (Andrade, 2013; Nascimento, 2014; Nunes et al., 2018) e de outras regiões do Brasil (Chagas Junior et al., 2009; Sampaio et al., 2016).

Chagas Junior et al., (2009), afirmam que a caracterização morfofisiológica contém informações importantes para identificar e agrupar estirpes de rizóbios. 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.

Os dados filogenéticos podem ser utilizados para a identificação da diversidade genética a partir de análises multivariadas. Com destaque para os métodos de agrupamento por otimização (método de Tocher) e os hierárquicos (dentre eles o UPGMA), essas análises permitem a avaliação simultânea de várias características utilizando dentre seus critérios, a porcentagem de dissimilaridade existente entre os isolados (Cruz et al., 2004). O método de Tocher, adota o critério de manter a distância média intragrupo menor do que a distância intergrupos (Rao, 1952). O UPGMA utiliza a média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo (Cruz et al., 2004).

Pelo método de agrupamento de Tocher, verificou-se que os isolados coletados em solos de Tianguá-CE foram reunidos em cinco grupos de diversidade (A, B, C, D e E), os do Piauí em dois grupos (A e B) e os do Maranhão em nove grupos (A, B, C, D, E, F, G, H e I) (Tabela 3).

Tabela 3. Grupos de isolados noduladores do feijão-fava cultivados em solos de Tianguá – CE, Várzea Grande – PI e São Domingos do Maranhão - MA, estabelecidos pelo método de Tocher, com base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas.

GRUPO	ISOLADOS (Tianguá – CE)											
A	CE19	CE52	CE18	CE36	CE15	CE02	CE10	CE49	CE40	CE17	CE06	CE32
B											CE34	CE48
C											CE27	
D											CE43	
E											CE03	
GRUPO	ISOLADOS (Várzea Grande – PI)											
A	PI02	PI03	PI04	PI08	PI10	PI11	PI12	PI13	PI17	PI18	PI21	PI25
											PI40	PI45
B											PI09	PI49
											PI26	
GRUPO	ISOLADOS (São Domingos do Maranhão – MA)											
A	MA13	MA49	MA11	MA48	MA03	MA06	MA53	MA56	MA12	MA51	MA52	MA29
											MA31	MA55
B											MA62	MA46
											MA27	MA39
C											MA59	MA45
											MA61	MA36
D											MA08	MA18
											MA21	MA07
E											MA01	
											MA17	MA22
F											MA32	MA20
											MA14	MA25
G											MA15	
											MA33	MA41
H											MA37	MA42
											MA54	
I											MA28	

Nos dendrogramas de dissimilaridade das características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas construídos pelo método hierárquico UPGMA, os isolados do Ceará, Piauí e Maranhão formaram respectivamente 16, 17 e 38 perfis fenotípicos. Estes resultados sugerem que os isolados podem estar em duplicidade entre os representantes do Ceará e Maranhão, uma vez que a porcentagem de diversidade genética diminuiu em relação aos critérios analisados. Com isso há a necessidade do uso da biologia molecular para obter-se uma classificação detalhada dos mesmos.

Utilizando uma linha de corte de 52% de dissimilaridade observou-se no dendrograma do Ceará a formação de seis grupos (A, B, C, D, E e F) de diversidade genética, dos quais o grupo B reuniu o maior número de isolados

(oito isolados – 47%) e os grupos C, E e F são formados por ramos monofiléticos (Figura 1). Entre os grupos formados, CE43 pertencente ao grupo F foi o isolado com o maior número de caracteres fenotípicos divergentes, uma vez que agrupou-se aos demais isolados somente a 100% de dissimilaridade. Além disso a presença de uma possível duplicada no grupo A (CE19, CE52) diminuiu a diversidade genética para 94% (Figura 1).

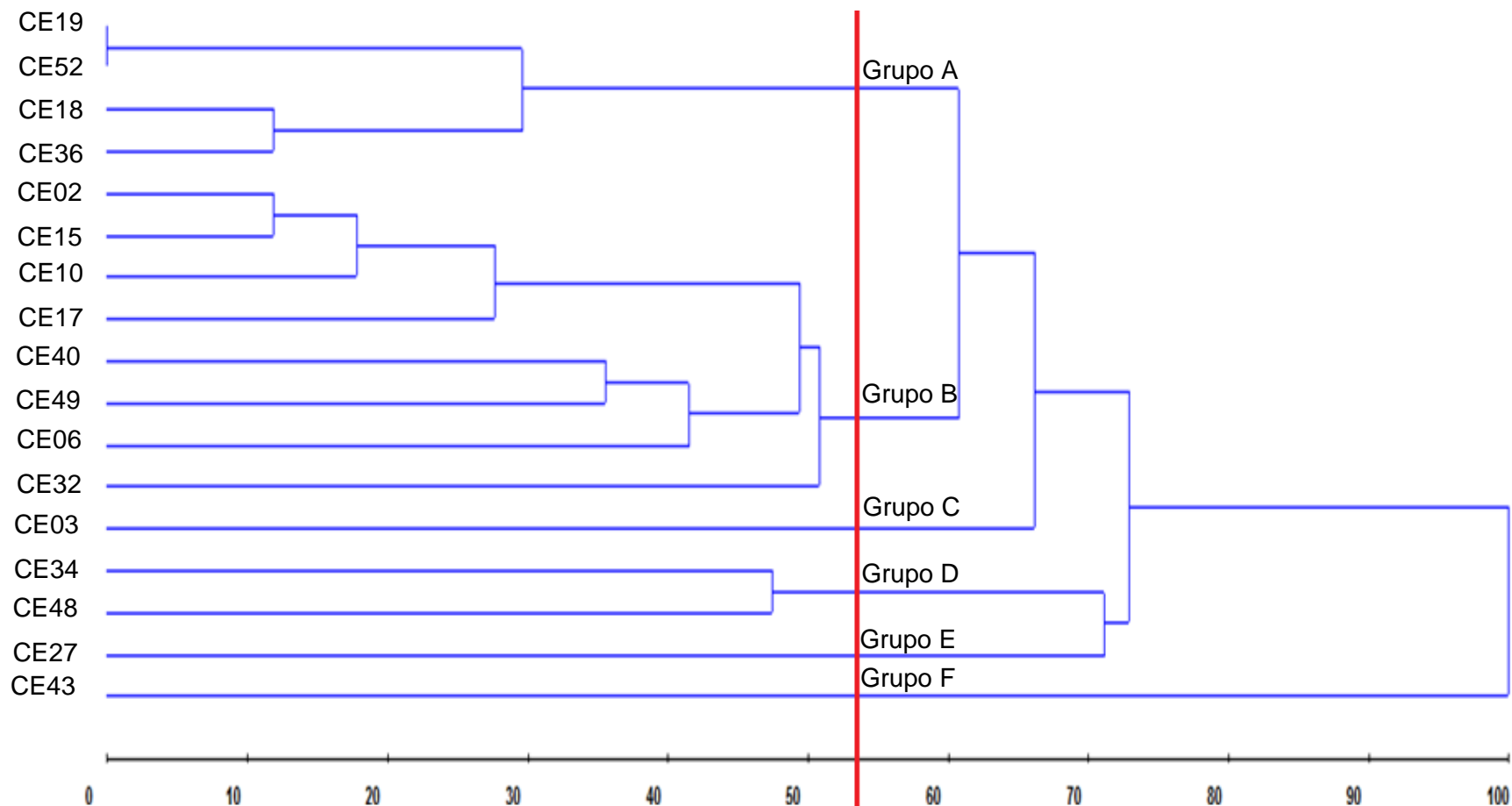


Figura 1. Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 17 isolados bacterianos associados ao Feijão-fava cultivado em solos de Tianguá - CE. O coeficiente de Simple 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 52%.

Em relação aos isolados do Piauí, a partir de 48% de dissimilaridade, observou-se no dendrograma a presença de cinco grupos (A, B, C, D e E) de diversidade (Figura 2). Diferente dos dendrogramas dos estados do Maranhão e Ceará, o do Piauí, não exibiu a presença de possíveis duplicatas, conseqüentemente, o número de perfis filogenéticos (17) foram iguais aos de isolados (17). Dentre os agrupamentos formados observou-se a presença de grupos monofiléticos nos grupos D (PI09) e E (PI26). Esse último agrupou-se aos demais isolados, a 100% de dissimilaridade (Figura 2).

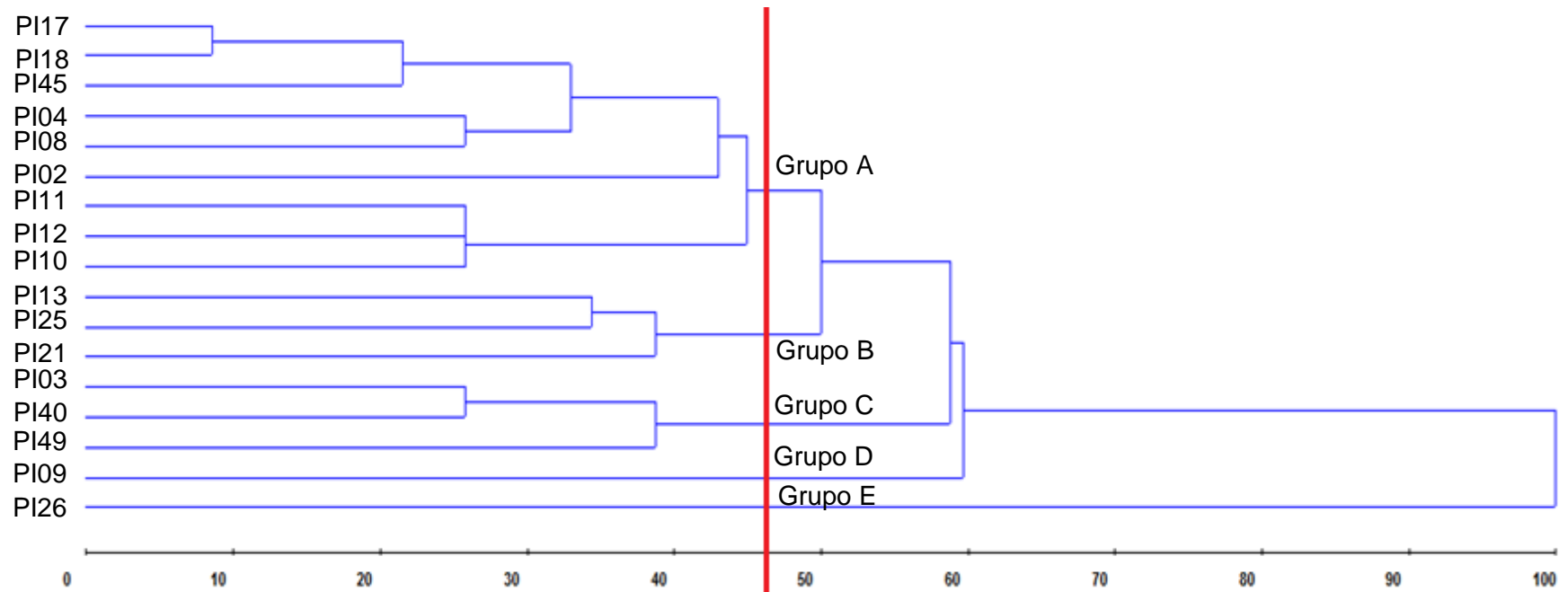


Figura 2. Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 17 isolados bacterianos associados ao Feijão-fava cultivado em solos de Várzea Grande - PI. O coeficiente de Simple 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 48%.

Nos isolados do Maranhão evidenciou-se a formação de 13 grandes grupos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L e M) de diversidade, dos quais o grupo A exibiu o agrupamento mais complexo, formado de 23 isolados distribuídos em 21 subgrupos e os grupos monofiléticos (B, C, D, E, H, I, K, L, M) (Figura 3). A possibilidade da presença de duplicatas nos subgrupos A1 (MA55, MA62) e A11 (MA13, MA49) do grupo A e no subgrupo F1 (MA27, MA39) no grupo F diminuíram a diversidade genética para 92,7% (Figura 3).

Essas porcentagens evidenciam que esses isolados possuem um maior número de caracteres divergentes em relação aos demais. O agrupamento dos isolados pelas similaridade das características fenotípicas ocorreu a partir de 28% de dissimilaridade, indicando que os isolados compartilham muitas características em comum e podem pertencer ao mesmo gênero (Figura 3).

O tipo de cultivo do feijão-fava realizado em São Domingos do Maranhão – MA, que seleciona as variedades mais adaptadas as condições edafoclimáticas da região (Soares, 2018), favorece a simbiose e conseqüente aumento na quantidade e diversidade de rizóbios se comparado com Tianguá-CE e Várzea Grande – PI.

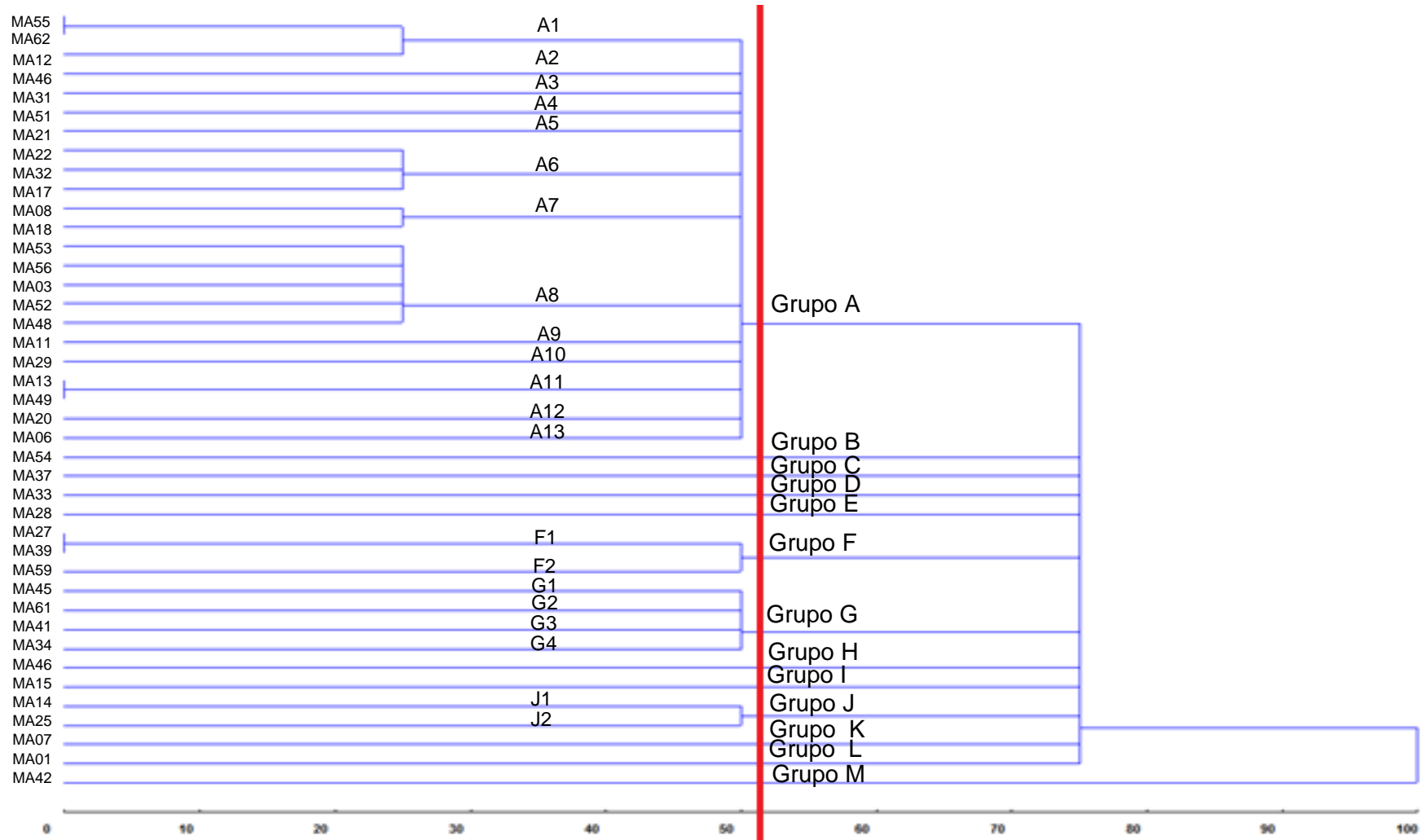


Figura 3. Dendrograma obtido pelo agrupamento hierárquico realizado pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética usando caracterização morfofisiológica e bioquímica de 41 isolados bacterianos associados ao Feijão-fava cultivado em solos de São Domingos do Maranhão – MA. O coeficiente 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 52%.

O compartilhamento de caracteres morfofisiológicos e bioquímicos entre os isolados pertencentes aos maiores grupos de diversidade dos três estados confirmam uma possível semelhança dos tipos de isolados encontrados nessas regiões. Além disso, corroboram sobre a influência que o solo e as condições edafoclimáticas exercem no processo de simbiose entre rizóbios e leguminosas e sua capacidade de se adaptar ao meio onde habitam (Marschner et al., 2004).

O agrupamento realizado pelo método de Tocher e UPGMA são eficientes na diferenciação da diversidade genética entre os isolados noduladores de feijão-fava coletados de solos dos estados do Ceará, Piauí e Maranhão. No entanto, os métodos exibiram variações na quantidade de grupos formados, onde o UPGMA foi mais restritivo permitindo uma melhor distinção dos isolados.

3.4 Caracterização bioquímica

O teste de coloração de Gram é um dos passos iniciais para a identificação de rizóbios. É uma técnica simples que consiste em preparações histológicas onde são detectadas as diferenças de composição química e integridade da parede celular a partir de observações ao microscópio óptico (Gram, 1884). Comumente os rizóbios são classificados como bactérias bastonetes e Gram-negativas (Sankhla et al., 2015; Shamseldin et al., 2017).

Dentre os 155 isolados purificados (49 – CE, 45 – PI e 61 – MA) 17 do Ceará, 17 do Piauí e 41 do Maranhão foram classificados pela coloração de Gram como bastonetes Gram-negativos. Verificando-se a habilidade dos isolados de produzirem e liberarem enzimas específicas observou-se que na atividade ureolítica, os isolados (cinco - 29,41%) do Ceará, exibiram maior capacidade de degradar ureia em formas mais simples de nitrogênio (amônia e anidrido carbônico) do que os dos estados do Piauí e Maranhão (Tabela 4). A comprovação do resultado positivo para o teste foi verificado pela formação de um halo róseo ao redor das colônias.

Tabela 4. Número de isolados bacterianos coletados em solos de Tianguá – CE, Várzea Grande - PI e São Domingos do Maranhão - MA, usados como inóculo de feijão-fava que apresentaram respostas positivas aos testes bioquímicos.

ESTADOS	U	A	P	L	CMC	G	C	S.F	AIA
MA	7	17	9	5	4	34	40	30	40
CE	5	-	1	1	2	7	17	11	17
PI	3	1	1	6	3	6	17	13	17
TOTAL	15	18	11	12	7	47	74	54	74

U = teste de urease; A = teste de amilase; P = teste de protease; L= teste de lipase; CMC = teste de carboxil-metil-celulose; G = teste de gelatinase; C = teste de catalase; SF = teste de solubilização de fosfato; AIA = ácido indol 3-acético.

No teste de amilase, que avalia a capacidade da enzima amilase em degradar o amido em moléculas de glicose, observou-se que somente os isolados do estado do Ceará não exibiram essa habilidade, pois não houve a formação de halo branco redor das colônias. Os isolados do Maranhão (17 isolados - 41,46%) foram mais reativos ao teste em comparação aos do Piauí (1 isolado - 5,88%) (Tabela 4). Os resultados positivos para esse teste corroboram com Saliu (2009), que afirma que bactérias gram-negativas do tipo bastonetes são capazes de produzir amilase. No entanto, o baixo índice na produção de amilase por bactérias deve-se principalmente ao fato de sua produção ser mais comum em fungos (Prado, 2009).

A avaliação da capacidade dos isolados produzirem a enzima protease a partir da degradação da proteína caseína foi confirmada pela formação de halo transparente ao redor das colônias. Os isolados do Maranhão (nove - 21,95%) exibiram maior habilidade em produzir a enzima protease em comparação aos demais estados avaliados (Tabela 4). Os isolados dos três estados exibiram baixa reatividade para a produção da enzima lipase (Tabela 4).

A produção das enzimas líticas amilase (Batista et al., 2017), protease e lipase estão indiretamente relacionadas com o crescimento das plantas através da supressão de patógenos, ao atuarem na lise da parede celular dos fungos patogênicos (Reddy, 2013). Segundo Kumari et al., (2010), urease, protease, amilase e gelatinase são enzimas que atuam no processo de formação dos

nódulos e consequente fixação de nitrogênio, o que garante melhor desempenho para os rizóbios que as produzem.

Assim como verificado com a lipase, os isolados dos três estados foram pouco reativos para a enzima celulase (Tabela 4). Essa enzima atua na degradação da celulose em moléculas de glicose, tornando-a disponível para os processos metabólicos. A formação de halo amarelo ao redor das colônias confirmou a positividade do teste. A enzima celulase atua na quebra da parede celular vegetal permitindo a infecção bacteriana nos pêlos radiculares e subsequente liberação das bactérias no filamento de infecção das células do nódulo hospedeiro, permitindo a colonização da planta (Compant et al., 2010; Nunes et al., 2018). Com isso, é uma enzima essencial no processo simbiótico entre rizóbios e leguminosas (Nunes et al., 2018), o que tem despertado interesse para seu uso na agricultura. Por possuir a capacidade de degradar compostos orgânicos, essa enzima tem sido também amplamente utilizada na indústria têxtil, de alimentos e produção de papel (Oliveira et al., 2018).

Gelatinase, catalase, solubilização de fosfato e AIA foram os testes bioquímicos com maior número de reações positivas entre os isolados dos três estados. Os isolados do Maranhão e do Ceará foram os mais reativos para o teste de gelatinase, onde respectivamente 34 (82,92%) e sete (41,17%) deles foram capazes de degradar a gelatina em polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos (Tabela 4). A confirmação da positividade do teste foi verificada pela observação do estado líquido do meio de cultura quando colocado por pelo menos duas horas em baixas temperaturas. A hidrólise da gelatina é uma característica importante na diferenciação dos microrganismos e pode ser usada para determinar sua patogenicidade através da sua capacidade de quebrar o colágeno e se espalhar pelo organismo hospedeiro (Pillay et al., 2018).

A atividade catalítica positiva foi observada nos 17 isolados (100%) do Ceará e nos do Piauí. Somente o isolado MA21 (2,43%) do Maranhão não exibiu a liberação de oxigênio molecular, observado pela formação de bolhas de gás ao redor das colônias após a adição de peróxido de hidrogênio (Tabela 4). Bactérias com atividade catalítica possuem a função de proteger plantas com estresse químico, ambiental e mecânico (Kumar et al. 2012), mantendo os

níveis de ROS (reação de espécies de oxigênio) durante o estresse (Cowell et al., 1994).

A capacidade de solubilização de fosfato em meio de cultura contendo fosfato de cálcio foi verificada na maioria dos isolados dos três estados (11 - 64,70% do Ceará, 13 - 76,47% do Piauí e 30 - 73,17% do Maranhão) (Tabela 4). Vários trabalhos relatam que diferentes microrganismos, distribuídos entre bactérias, fungos, actinomicetos e algas tem habilidade de solubilizar fosfato de cálcio (P-Ca) (Mohammadi, 2012; Santos et al., 2012; Walpola e Yoon, 2012; Kaur e Reddy, 2015; Zhu et al., 2018). Dentre esses microrganismos, destaca-se os rizóbios, que demonstram serem um dos mais eficientes solubilizadores (Pande et al., 2017; Rodrigues et al., 2018).

O fósforo é o segundo nutriente de maior importância para os processos básicos da vida, sendo utilizado em diversas atividades metabólicas (Mondal et al., 2018). Após o nitrogênio, é o macronutriente mais limitante para o crescimento das plantas (Behera et al., 2014). Sua disponibilidade controla o crescimento e desenvolvimento de todas as culturas (Wyngaard et al., 2016). Na maioria dos solos há uma grande quantidade de fósforo inorgânico e orgânico, no entanto, ele encontra-se na forma imobilizada ficando indisponível para a planta (Adesemoye e Kloepper, 2009).

Microrganismos solubilizadores de fosfato, tais como as bactérias, tem um papel importante no crescimento das plantas convertendo o fósforo insolúvel em solúvel (Zaidi et al., 2017) e aumentando a eficiência da fixação biológica do nitrogênio (Chagas Junior et al., 2009), o que promoverá a formação e rendimento das sementes, o aumento das ramificações radiculares, a capacidade de resistência a doenças (Sharma et al., 2013) e uma possível aplicação das bactérias nos campos de cultivo (Wahyudi et al., 2011). No entanto, é um fenômeno complexo, que depende de muitos fatores, tais como nutricionais e condições de crescimento da cultura (Behera et al., 2014).

Assim como foi verificado com o teste de catalase, os isolados dos três estados exibiram elevada produção de AIA na presença de L-triptofano: 17 (100%) do Ceará, 17 (100%) do Piauí e 40 (98%) do Maranhão. Somente o isolado MA32 (2,43%) não revelou essa habilidade (Tabela 4). O triptofano é o principal precursor da biossíntese desse fitohormônio aumentando a produção de AIA (Mohite, 2013). Condições de cultura, estágio de crescimento e

disponibilidade de substrato são fatores que podem influenciar na síntese de AIA (Mirza et al., 2001).

Estima-se que 80% de todos os isolados da rizosfera do solo são capazes de produzir substâncias regulatórias de crescimento como metabolitos secundários (Patten e Glick, 1996). O AIA é um dos fitoestimulantes mais estudados produzidos por bactérias dentre elas os rizóbios (Goulart-Machado et al., 2018) e um dos mais eficazes indutores de crescimento vegetal (Vargas et al., 2017). A produção de AIA por bactérias tem efeito positivo no desenvolvimento do sistema radicular, através do aumento do número de pêlos e raízes radiculares, o que ajuda na absorção de água e nutrientes essenciais, estimulando assim o seu crescimento (Kumari et al., 2018). Com isso, a produção de AIA é uma ferramenta eficaz na seleção de microrganismos benéficos na promoção do crescimento das plantas (Wahyudi et al., 2011).

No entanto, seu efeito nas plantas depende da sensibilidade da planta, da quantidade produzida, da indução de outros fitohormônios (Reddy, 2013) e da interação entre os microrganismos (Agrawal e Shukla, 2016). Segundo Patten e Glick (2002), baixos níveis de AIA podem estimular o alongamento, enquanto altos níveis de AIA bacteriano estimulam a formação de raízes laterais e adventícias.

Isolados que reúnam características que favoreçam o crescimento da planta tais como: capacidade de degradação e disponibilização de compostos orgânicos e inorgânicos à planta (exemplo: nitrogênio), solubilização de fosfato e produção de substâncias antioxidantes, podem ser classificados como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP's) (Ahemad e Kibret, 2014). Nas análises dos testes bioquímicos, o isolados que reuniram em cada estado o maior número de resultados positivos em relação aos nove testes avaliados foram: CE06, CE32 e CE40 (cinco testes), CE19, CE36, CE43, CE49, CE52 (quatro testes) do Ceará, PI04, PI26 (seis testes), PI08, PI10, PI11, PI12 (cinco testes) do Piauí, MA28 (sete testes), MA17, MA25, MA31, MA55, MA62 (seis testes) do Maranhão (apêndice 1, 2, 3).

A diferença entre a quantidade de testes positivos observados entre os isolados dos três estados pode ser um critério a ser empregado na seleção de estirpes bacterianas eficientes no processo de nodulação e crescimento do *Phaseolus lunatus* L. Além disso, esses isolados podem ser classificados

como potenciais BPCP's, capacitando-os a serem utilizados como inoculantes nas práticas agrícolas, uma vez que dentre suas contribuições eles atuam como biofertilizantes e estimuladores de tolerância às condições de estresse (Glick, 2012).

A taxonomia polifásica está sendo amplamente utilizada para classificar os procariotos (Das et al., 2014; Ribeiro et al., 2015). Embora a caracterização molecular apresente ferramentas mais precisas na identificação de novas espécies de rizóbios, a caracterização fenotípica, que se baseia nas análises morfológicas, fisiológicas e bioquímicas é um passo inicial para a identificação da similaridade entre os grupos de rizóbios estudados e a diversidade das espécies, além de permitir uma melhor compreensão do papel que eles exercem na promoção do crescimento das plantas (Cordero et al., 2016, Oliveira et al., 2018).

De acordo com Ikeda et al., (2013) o isolamento e caracterização de bactérias com potencial para promover o crescimento vegetal e com capacidade de fixar nitrogênio são importantes para o avanço do conhecimento sobre as interações planta-bactéria, bem como para potenciais benefícios econômicos e ambientais da sua aplicação na agricultura.

4 CONCLUSÕES

As análises morfofisiológicas e bioquímicas foram eficientes na diferenciação dos isolados noduladores do feijão-fava encontrados em solos do CE, PI e MA.

Os solos do Maranhão possuem maior riqueza e diversidade de isolados em relação aos dos estados do Ceará e Piauí.

CE06, CE32, CE40, PI04, PI26 e MA28 possuem o maior número de caracteres bioquímicos que os classificam como promotores de crescimento em *Phaseolus lunatus*.

5 REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A.O.; KLOEPPER, J.W. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 1-12, 2009.
- AGRAWAL, P.; JAIN, P. C. Study of native bioinoculants from the mung bean of district Sagar (MP) India. **Int. J. Plant Sci**, v. 4, p. 521-523, 2009.
- AGRAWAL, P.; SHUKLA, S. Diversity of root nodule bacteria from leguminous crops. **Archives of Biological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 195-205, 2016
- 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.
- ANDRADE, M.M.M. **Populações bacterianas nodulíferas de leguminosas em solos da caatinga com distintos períodos de regeneração**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 86f. 2013.
- ARAUJO, A.S.F.; LOPES, Â.C.A.; GOMES, R.L.F.; JUNIOR, J.E.A.B.; ANTUNES, J.E.L.; FIGUEIREDO, M.D.V.B. Diversity of native rhizobia-nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume Research-An International Journal**, v. 38, n. 5, p. 653-657, 2015.
- BATISTA, B. D.; ALMEIDA, J. R.; BEZERRA, T. E.; AZEVEDO, J.L.; QUECINE, M. C. Describing the Unexplored Microorganisms Associated with Guarana: A Typical Tropical Plant. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer. p. 293-312. 2017.
- BEHERA, B. C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R., DUTTA; S. K., THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 97-110, 2014.
- BEZERRA, B. R.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, J. A.; CARNEIRO, R. F. V. Fertilidade do solo e adubação. In: Ademir Sérgio Ferreira de Araújo; Ângela Celis de Almeida Lopes; Regina Lucia Ferreira Gomes. (Org.). **A cultura do feijão-fava na Região Meio-Norte do Brasil**. 1 ed. Teresina: EDUFPI, v.1, p.129-138. 2010.
- BOMFETI, C. A., FLORENTINO, L. A., GUIMARÃES, A. P., CARDOSO, P. G., GUERREIRO, M. C., MOREIRA, F. M. D. S. Exopolysaccharides produced by

the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 657-671, 2011.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia. Central. **Acta Amazonica**. n. 3. vol. 39. p.489 – 494. 2009.

COMPANT, S., CLÉMENT, C., SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

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, E. M., RIBEIRO, P. R. A., LIMA, W., FARIAS, T. P., MOREIRA, F. M. S. Lima bean nodulates efficiently with *Bradyrhizobium* strains isolated from diverse legume species. **Symbiosis**, v. 73, n. 2, p. 125-133, 2017.

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**, p. 1-14, 2018.

COSTA NETO, V. P., MENDES, J. B. S., ARAÚJO, A. S. F., ALCÂNTARA NETO, F., BONIFACIO, A., RODRIGUES, A. C. Symbiotic performance, nitrogen flux and growth of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) varieties inoculated with different indigenous strains of rhizobia. **Symbiosis**, v. 73, n. 2, p. 117-124, 2017.

COWELL, D. C., DOWMAN, A. A., LEWIS, R. J., PIRZAD, R., WATKINS, S. D. The rapid potentiometric detection of catalase positive microorganisms. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9, n. 2, p. 131-138, 1994.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV. 480p. 2004.

CRUZ, C. D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, p271-276, 2013.

DAS, S., DASH, H. R., MANGWANI, N., CHAKRABORTY, J., KUMARI, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of microbiological methods**, v. 103, p. 80-100, 2014.

DEES, C.; RINGELBERG, D.; 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.

DURÁN, D., REY, L., MAYO, J., ZÚÑIGA-DÁVILA, D., IMPERIAL, J., RUIZ-ARGÜESO, T., MARTÍNEZ-ROMERO, E., ORMEÑO-ORRILLO, E. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2072-2078, 2014.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

GOULART-MACHADO, R., SÁ, E. L. S., HAHN, L., PILATTI-SANT'ANA, W. L. Inoculation of plant growth promoting rhizobia in Sudan grass (*Sorghum x sudanense* (Piper) Stapf cv. *Sudanense*) and millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. cv. BRS1501). **Acta Agronómica**, v. 67, n. 1, p. 133-139, 2018.

GRAM, C. The differential staining of *Schizomycetes* in tissue sections and in dried preparations. **Fortschritte der Medicin**, v. 2, p. 185-189, 1884.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Agriculture Experimental Station Circular. 347p. 1950.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.) **Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-spi, p.45-61, 1994.

HUNGRIA, M., SILVA, K. D. **Manual de curadores de germoplasma-microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E). 22p. 2011.

HUNGRIA, M.; O'HARA, G.; ZILLI, J., ARAUJO, R.; DEAKER, R.; HOWIESON, J. Isolation and growth of rhizobia. In: Howieson JG, Dilworth MJ (eds) Isolation and growth of rhizobia. **Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)**, Canberra, p. 39–60. 2016.

IKEDA, A. C., BASSANI, L. L., ADAMOSKI, D., STRINGARI, D., CORDEIRO, V. K., GLIENKE, C., STEFFENS, M.B.R; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial ecology**, v. 65, n. 1, p. 154-160, 2013.

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.

- KAUR, G.; REDDY, M. S. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. **Pedosphere**, v. 25, n. 3, p. 428-437, 2015.
- KUMAR, A.; KUMAR, A.; DEVI, S.; PATIL, S.; PAYAL, C.; NEGI, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. **Recent research in science and technology**, v. 4, n. 1, 2012.
- 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.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A.; NEGRETE-YANKELEVICH, S.; ROGEL, M.A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean). **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 1, p. 33-38, 2013.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and soil**, v. 261, n. 1-2, p. 199-208, 2004.
- MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; 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.
- MATSUBARA, M.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D. Phenotypic and molecular differences among rhizobia that nodulate *Phaseolus lunatus* in the Supe valley in Peru. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1803-1808, 2015.
- 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.M.; SIQUEIRA, J.O. 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.
- MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.;

MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 47-54, 2001.

MOHAMMADI, K. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Resour Environ**, v. 2, n. 1, p. 80-85, 2012.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013.

MONDAL, S., HAQUE, S., KUNDU, D., DUTTA, D., GHOSH, A. R. Isolation and identification of phosphate-solubilizing microorganisms and distribution of orthophosphate in different seasons from sewage-fed East Kolkata Wetland. **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, v. 23, n. 3, p. 261-270, 2018.

NASCIMENTO, A.R.L. **Diversidade e caracterização de rizóbios associados ao feijão-fava no semiárido**. Serra Talhada- PE. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 53p. 2014.

NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.

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. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2018.

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.

ORMENO-ORRILLO, E.; VINUESA, P.; ZUNIGA-DAVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 3, p. 253-262, 2006.

PANDE, A.; PANDEY, P.; MEHRA, S.; SINGH, M.; KAUSHIK, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 379-391, 2017.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795-3801, 2002.

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.

PRADO, K.L.L. **Microrganismos produtores de amilase, celulase, fosfatase, lípase, protease e urease nos solos amazônicos do ramal do Brasileirinho (Manaus) e de urucu (Coari)**. Tese de Doutorado. Dissertação de mestrado em Biotecnologia, Universidade do Estado do Amazonas. 2009.

RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: J. Wiley, 330p. 1952.

REDDY, P.P. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: **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.

RIBEIRO, R.A.; MARTINS, T.B.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DELAMUTA, J.R.M.; ROGEL, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3162-3169, 2015.

RODRIGUES, D.R.; SILVA, A.F.; CAVALCANTI, M.I.P.; ESCOBAR, I.E.C.; FRAIZ, A.C.R.; RIBEIRO, P.R.A.; FERREIRA NETO, R.A.; FREITAS, A.D.S.; FERNANDES-JÚNIOR, P.I. Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 503-512, 2018

SALIU, B.K. Amylase activity of a yellow pigmented bacterium isolated from *Cassava waste*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 20, 2009.

SAMPAIO, F.B.; KNUPP, A.M.; FERNANDES, E.P.; MARTIN-DIDONET, C.C.G.; FERREIRA, E.P.B. Morphophysiological characterization of rhizobia isolated from wild genotypes of the common bean. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 6, 2016.

- 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, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; NEVES, M.C.P.; RUNJANEK, N.G.; BORGES, W.L.; BEZERRA, R.V.; FREITAS, A.D.S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.
- SANTOS, J.O.; ANTUNES, J.E.L.; ARAÚJO, A.S.F.; LYRA, M.C.C.P.; GOMES, R.L. F.; LOPES, A.C.A.; FIGUEIREDO, M.V.B. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 3, p. 437-444, 2011.
- SANTOS, I.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G.; OLIVEIRA, J.T.C.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.72, p.261-269, 1995.
- SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M.J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**, v. 3, n. 2, p. 91-109, 2017.
- SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.
- SINGH, B.; KAUR, R.; SINGH, K. Characterization of Rhizobium strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, 2008.
- 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.
- VARGAS, L.K.; VOLPIANO, C.G.; LISBOA, B.B.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Potential of rhizobia as plant growth-promoting rhizobacteria. In: **Microbes for legume improvement**. Springer, Cham, p. 153-174. 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**, v.91, p.27-141, 2001.

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

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.

WALPOLA, B.C.; YOON, M.H. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 37, p. 6600-6605, 2012.

WYNGAARD, N., CABRERA, M. L., JAROSCH, K. A., 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.

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.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. **Science of The Total Environment**, v. 612, p. 522-537, 2018.

APÊNDICE

Apêndice 1: Resultados dos testes bioquímicos realizados em isolados bacterianos oriundos de solo de Tianguá no Ceará usados como inóculo de feijão-fava.

ISOLADO	Testes bioquímicos – Tianguá/CE								
	U	P	A	L	CMC	G	C	SF	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$
CE02	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CE03	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CE06	+	-	-	-	-	+	+	+	+
CE10	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CE15	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CE17	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CE18	+	-	-	-	-	-	+	-	+
CE19	+	-	-	-	-	+	+	-	+
CE27	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CE32	-	-	-	+	-	+	+	+	+
CE34	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CE36	+	+	-	-	-	-	+	-	+
CE40	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CE43	-	-	-	-	+	-	+	+	+
CE48	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CE49	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CE52	+	-	-	-	-	+	+	-	+

U = teste de urease ; A = teste de amilase ; P = teste de protease; L= teste de lipase; CMC = teste de carboxil-metil-celulose; G = teste de gelatinase; C = teste de catalase; SF = teste de solubilização de fosfato; AIA= ácido indol-3-acético

Apêndice 2: Resultados dos testes bioquímicos realizados em isolados bacterianos oriundos de solo de Várzea Grande no Piauí usados como inóculo de feijão-fava.

ISOLADO	Testes bioquímicos – Várzea Grande /PI								
	U	P	A	L	CMC	G	C	SF	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$
PI02	-	-	-	+	-	-	+	-	+
PI03	-	-	-	-	-	+	+	-	+
PI04	+	-	-	+	+	-	+	+	+
PI08	+	-	-	-	+	-	+	+	+
PI09	-	-	-	+	-	-	+	+	+
PI10	-	-	-	+	-	+	+	+	+
PI11	-	-	-	+	-	+	+	+	+
PI12	-	-	-	+	-	+	+	+	+
PI13	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PI17	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PI18	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PI21	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PI25	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PI26	-	+	+	-	+	+	+	-	+
PI40	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PI45	+	-	-	-	-	-	+	+	+
PI49	-	-	-	-	-	+	+	-	+

U = teste de urease; A = teste de amilase ; P = teste de protease; L= teste de lipase; CMC = teste de carboxil-metil-celulose; G = teste de gelatinase; C = teste de catalase; SF = teste de solubilização de fosfato, AIA= ácido indol-3-acético.

Apêndice 3: Resultados dos testes bioquímicos realizados em isolados bacterianos oriundos de solo de São Domingos do Maranhão usados como inóculo de feijão-fava.

ISOLADO	Testes bioquímicos –São Domingos do Maranhão/MA								
	U	P	A	L	CMC	G	C	SF	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$
MA01	+	-	+	-	-	-	+	-	+
MA03	-	-	-	-	-	+	+	+	+
MA06	-	-	-	-	-	+	+	-	+
MA07	+	-	-	-	-	+	+	-	+
MA08	+	-	+	-	-	+	+	-	+
MA11	-	-	-	-	-	+	+	+	+
MA12	-	-	+	-	-	+	+	+	+
MA13	-	-	-	-	-	+	+	+	+
MA14	-	-	+	-	-	+	+	+	+
MA15	-	-	-	-	-	-	+	+	+
MA17	-	-	+	+	-	+	+	+	+
MA18	+	-	+	-	-	+	+	-	+
MA20	-	-	+	-	-	-	+	+	+
MA21	+	-	-	-	-	+	-	-	+
MA22	-	-	+	-	-	+	+	+	+
MA25	-	+	+	-	-	+	+	+	+
MA27	-	+	-	-	-	+	+	+	+
MA28	+	-	+	+	-	+	+	+	+
MA29	-	+	-	-	-	+	+	+	+
MA31	+	-	+	-	-	+	+	+	+
MA32	-	-	+	-	-	+	+	+	-
MA33	-	+	-	+	-	+	+	-	+
MA34	-	-	+	+	-	-	+	+	+
MA36	-	-	+	-	-	+	+	+	+
MA37	-	-	-	-	+	+	+	-	+
MA39	-	+	-	-	-	+	+	+	+
MA41	-	+	-	-	-	-	+	-	+
MA42	-	+	-	-	+	+	+	-	+
MA45	-	-	-	-	-	-	+	+	+
MA46	-	-	+	-	-	+	+	+	+
MA48	-	-	-	-	-	+	+	+	+
MA49	-	-	-	-	-	+	+	+	+
MA51	+	-	-	-	-	+	+	+	+
MA52	-	-	-	+	-	+	+	+	+
MA53	-	-	-	-	-	+	+	+	+
MA54	-	-	-	-	-	+	+	-	+
MA55	-	-	+	-	+	+	+	+	+
MA56	-	-	-	-	-	+	+	+	+
MA59	-	+	-	-	-	+	+	+	+
MA61	-	+	-	-	-	-	+	+	+
MA62	-	-	+	-	+	+	+	+	+

U = teste de urease ; A = teste de amilase ; P = teste de protease; L= teste de lipase;
 CMC = teste de carboxil-metil-celulose; G = teste de gelatinase; C = teste de catalase;
 SF = teste de solubilização de fosfato; AIA= ácido indol-3-acético

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)

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 AMILSASE

() 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:** _____