



**CLAUDYANNE DO NASCIMENTO COSTA**

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS NA  
PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO-FAVA DE DIFERENTES  
GRUPOS GÊNICOS**

**TERESINA-PI  
2020**

**CLAUDYANNE DO NASCIMENTO COSTA**

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS NA PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO-FAVA DE  
DIFERENTES GRUPOS GÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia- Agricultura Tropical, para obtenção do título de Doutora em Ciências com área de concentração em Agricultura Tropical.

Orientador

Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

**TERESINA-PI 2020**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Divisão de Processos Técnicos

C837e Costa, Claudyanne do Nascimento.  
Eficiência simbiótica de rizóbios na produtividade do feijão-fava de diferentes grupos gênicos. / Claudyanne do Nascimento Costa. – 2020.  
51 p.  
Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura Tropical, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.  
"Orientação: Ademir Sérgio Ferreira de Araújo".  
1. *Bradyrhizobium sp.*. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Grupos gênicos. 4. Inoculação e *Phaseolus lunatus*. I. Título.

CDD 635.651

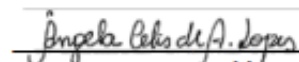
CLAUDYANNE DO NASCIMENTO COSTA

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS NA PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO-FAVA DE  
DIFERENTES GRUPOS GÊNICOS

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

APROVADA em 30 de setembro de 2020.

Comissão Julgadora:



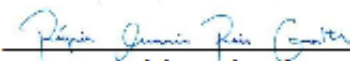
Prof. Dra. Angela Célis Almeida Lopes – CCA/UFPI



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



Prof. Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas – UFPE



Prof. Dra. Régia Maria Reis Gualter – IFMA



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

TERESINA-PI

2020

À Deus, por sua infinita bondade. Aos meus pais Antonio Carlos e Creusa Pereira que com imensurável apoio, incentivo e compreensão, me proporcionaram chegar até aqui, aos meus irmãos Carlyanne Costa e Antonio Filho por todo afeto e ao meu esposo Diego Passos pela paciência e incentivo sempre.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Á Deus por estar sempre ao meu lado, que nunca me deixou desistir, sempre me concedendo força, coragem, sabedoria para atingir os meus objetivos.

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Agricultura Tropical pela oportunidade para realização deste curso.

Ao meu orientador, Professor Ademir Sérgio Ferreira de Araújo por todos os ensinamentos, pela força durante essa caminhada na condução deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Professor Jadson Emanuel Antunes pela amizade e parceria construídas durante todo o doutorado.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Agricultura Tropical pelos ensinamentos e incentivos.

À CAPES pela concessão da bolsa pelo auxílio financeiro para realização dessa pesquisa e pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional;

Ao Instituto Federal do Ceará na pessoa do Professor Cleilton da Silva Ferreira pela disponibilização do ambiente para realização do experimento em campo.

Aos colegas que o Doutorado me apresentou (Marineide Amorim, Mariane Pertile, João Pedro Aquino, Sandra Mara Rocha) e do laboratório pela colaboração durante as disciplinas cursadas e principalmente pelos consideráveis auxílios para execução de toda esta pesquisa.

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional e aos meus irmãos que sempre me incentivaram a ir à busca de maiores conhecimentos.

Ao meu marido, que sempre me apoiou nas minhas decisões, me incentivando sempre na busca do conhecimento.

A minha família, parentes e amigos que incentivando, acreditaram que tudo isto seria possível,

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| <b>RESUMO GERAL</b> .....   | vi   |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | vii  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | viii |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | ix   |
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 09   |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....   | 12   |
| 2.1. Feijão-fava ( <i>Phaseolus lunatus</i> ) .....   | 12   |
| 2.2. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) .....  | 14   |
| 2.3. Influência do tamanho das sementes e das condições ambientais na<br>eficiência da FBN .....  | 16   |
| <b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 19   |
| <b>CAPÍTULO I – Seeds size influences rhizobia on plant growth, nodulation<br/>and N fixation in lima bean</b>                                      |      |
| Abstract .....  | 27   |
| 1. Introduction .....   | 27   |
| 2. Materials and methods .....  | 28   |
| 3. Results .....  | 30   |
| 4. Discussion .....   | 34   |
| 5. Conclusions .....  | 36   |
| 6. References .....   | 36   |
| <b>CAPÍTULO II – Inoculation of rhizobia increases lima bean (<i>Phaseolus<br/>lunatus</i>) yield in soils from Piauí and Ceará states, Brazil.</b> |      |
| Abstract .....  | 39   |
| 1. Introduction .....   | 39   |
| 2. Materials and methods .....  | 40   |
| 3. Results .....  | 42   |
| 4. Discussion .....   | 43   |
| 5. Conclusion .....   | 45   |
| 6. References .....   | 45   |
| 7. Considerações Finais .....   | 48   |

## RESUMO GERAL

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma leguminosa de grande importância para os estados do Nordeste brasileiro devido ao potencial econômico e nutricional para os agricultores familiares. Para melhorar estes dois fatores, a utilização de métodos sustentáveis e de baixo custo que incrementem a produção, são alternativas bastante requisitadas. Pensando nisso, a simbiose do feijão-fava com bactérias fixadoras de nitrogênio pode ser uma ótima alternativa. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de isolados de rizóbios em diferentes genótipos e ambientes de cultivo dessa leguminosa. Para isso, foram utilizados 5 isolados de rizóbios (UFPI-18, UFPI-32, UFPI-38, UFPI-50 e UFPI-59), selecionados e comparados a uma estirpe referência (CIAT 899) e a dois controles (com N e sem N) e inoculados em vasos contendo sementes grandes (acesso UFPI-480) e pequenas (acesso UFPI-1120) de feijão-fava cultivados em solos de Teresina. Desta forma, observou-se que, as sementes grandes proporcionaram maior nodulação, crescimento das plantas e maior eficiência na fixação de nitrogênio quando comparadas às sementes pequenas, sendo o isolado UFPI-59 responsável pelos maiores valores de peso seco da parte aérea, dos nódulos e da raiz, enquanto o isolado UFPI-32 promoveu os maiores números de nódulos. Já em relação ao acúmulo de N, os isolados UFPI-38 e UFPI-59 obtiveram os melhores resultados, sendo que o UFPI-38 apresentou a maior eficiência quando inoculado em ambas as sementes, enquanto o UFPI-59 apresentou eficácia quando inoculado apenas nas sementes pequenas. Deste modo, o estudo mostrou que o tamanho das sementes influenciou o crescimento, a nodulação e a fixação biológica do feijão-fava. Diante disso, foram selecionados os isolados de rizóbios UFPI-32, UFPI-38 e UFPI-59 para avaliação do comportamento em campo sob diferentes condições ambientais nos estados do Piauí e Ceará. Os parâmetros de nodulação, acúmulo de N e produção variaram entre os tratamentos e locais, onde foi observada maior biomassa de nódulos nas plantas inoculadas com os isolados UFPI-32 e UFPI-59 (Piauí) e CIAT899 e UFPI-32 (Ceará). Em relação ao tamanho dos nódulos, o isolado UFPI-59 apresentou os melhores resultados nos dois locais, enquanto os maiores acúmulos de nitrogênio foram encontrados nas folhas das plantas inoculadas com os rizóbios UFPI-59 e CIAT 899. Quanto à produtividade, o isolado UFPI-59 proporcionou maior rendimento em grãos em comparação ao CIAT 899 e aos controles. Diante disso, pode-se concluir que o isolado UFPI-59 apresentou grande potencial na promoção da nodulação, acúmulo de N, crescimento de plantas e produção de feijão-fava nos dois ambientes, podendo ser indicado como possível inoculante para essa cultura.

**Palavras-chave:** *Bradyrhizobium* sp., fixação biológica de nitrogênio, grupos gênicos, inoculação e *Phaseolus lunatus*.



## ABSTRACT

The Lima bean (*Phaseolus lunatus*) is a legume of great importance for the states of Northeast Brazil due to the economic and nutritional potential for family farmers. To improve these two factors, the use of sustainable and low-cost methods that increase production are highly requested alternatives. With that in mind, the symbiosis of fava beans with nitrogen-fixing bacteria can be a great alternative. Thus, the present study aimed to evaluate the influence of rhizobia isolates in different genotypes and environments of cultivation of this legume. For this, 5 rhizobia isolates (UFPI-18, UFPI-32, UFPI-38, UFPI-50 and UFPI-59) were used, selected and compared to a reference strain (CIAT 899) and two controls (with N and without N) and inoculated in pots containing large (UFPI-480 access) and small (UFPI-1120 access) seeds of fava beans grown in Teresina soils. Thus, it was observed that large seeds provided greater nodulation, plant growth and greater efficiency in fixing nitrogen when compared to small seeds, with the UFPI-59 isolate responsible for the highest dry weight values of the aerial part, nodules and the root, while the UFPI-32 isolate promoted the largest number of nodules. Regarding the N accumulation, the UFPI-38 and UFPI-59 isolates obtained the best results, with UFPI-38 showing the highest efficiency when inoculated in both seeds, while UFPI-59 showed efficacy when inoculated only in the seeds. small seeds. Thus, the study showed that the size of the seeds influenced the growth, nodulation and biological fixation of fava beans. Therefore, UFPI-32, UFPI-38 and UFPI-59 rhizobia isolates were selected to assess field behavior under different environmental conditions in the states of Piauí and Ceará. The parameters of nodulation, N accumulation and production varied between treatments and locations, where a greater nodule biomass was observed in plants inoculated with the isolates UFPI-32 and UFPI-59 (Piauí) and CIAT899 and UFPI-32 (Ceará). Regarding the size of the nodules, the UFPI-59 isolate showed the best results in both locations, while the largest nitrogen accumulations were found in the leaves of plants inoculated with the rhizobia UFPI-59 and CIAT 899. As for productivity, the UFPI isolate -59 provided higher grain yield compared to CIAT 899 and controls. Therefore, it can be concluded that the UFPI-59 isolate had great potential in promoting nodulation, N accumulation, plant growth and production of fava beans in both environments, which can be indicated as a possible inoculant for this culture.

**Keywords:** *Bradyrhizobium* sp, biological nitrogen fixation, gene groups, inoculation and *Phaseolus lunatus*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** Shoot (A) and root (B) dry weight of lima bean inoculated with rhizobia isolates in small and large seeds. Similar lower case letters comparing seeds sizes for the same treatment, and capital letters comparing treatments for the same seeds size do not differ significantly by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). \*UFPI-18 (*Enterobacter sp.*), UFPI-32 (*Bradyrhizobium sp.*), UFPI-38 (*Rhizobium sp.*), UFPI-50 (*Bradyrhizobium sp.*), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium sp.*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), NC (negative control), PC (positive control) ----- **33**
- Figure 2.** Nodule number (A) and nodule dry weight (B) in lima bean inoculated with rhizobia isolates in small and large seeds. Similar lower case letters comparing seeds sizes for the same treatment, and capital letters comparing treatments for the same seeds size do not differ significantly by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). \*UFPI-18 (*Enterobacter sp.*), UFPI-32 (*Bradyrhizobium sp.*), UFPI-38 (*Rhizobium sp.*), UFPI-50 (*Bradyrhizobium sp.*), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium sp.*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), NC (negative control), PC (positive control)- **34**
- Figure 3.** Accumulated N (A) and effectiveness (B) in lima bean inoculated with rhizobia isolates in small and large seeds. Similar lower case letters comparing seeds sizes for the same treatment, and capital letters comparing treatments for the same seeds size do not differ significantly by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). \*UFPI-18 (*Enterobacter sp.*), UFPI-32 (*Bradyrhizobium sp.*), UFPI-38 (*Rhizobium sp.*), UFPI-50 (*Bradyrhizobium sp.*), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium sp.*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), NC (negative control), PC (positive control)- **35**
- Figure 4.** Principal component analysis biplot (PCA) based on the treatments\* and the evaluated parameters (NN -Nodule number; NDW-nodule dry weight, SDW-shoot dry weight, RDW-root dry weight, AcN- Accumulated N, effectiveness) in relation to seeds size. The significance of treatments on related parameters are indicated by the arrows. \*UFPI-18 (*Enterobacter sp.*), UFPI-32 (*Bradyrhizobium sp.*), UFPI-38 (*Rhizobium sp.*), UFPI-50 (*Bradyrhizobium sp.*), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium sp.*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), NC (negative control), PC (positive control) ----- **36**

**LISTA DE TABELAS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Table 1.</b> Chemical properties of the soils used in this study-----  | <b>42</b> |
| <b>Table 2.</b> Values of NN (nodule $\text{pl}^{-1}$ ), NDW ( $\text{mg pl}^{-1}$ ), NS ( $\text{mg nodule}^{-1}$ ), SDW ( $\text{g pl}^{-1}$ ), RDW ( $\text{g pl}^{-1}$ ), and leaf N (%) in lima bean inoculated with rhizobia and grown in Ceará state. At 45 days of lima bean sowing ----- | <b>44</b> |
| <b>Table 3.</b> Values of NN (nodule $\text{pl}^{-1}$ ), NDW ( $\text{mg pl}^{-1}$ ), NS ( $\text{mg nodule}^{-1}$ ), SDW ( $\text{g pl}^{-1}$ ), RDW ( $\text{g pl}^{-1}$ ), and leaf N (%) in lima bean inoculated with rhizobia and grown in Piauí state. At 45 days of lima bean sowing ----- | <b>45</b> |
| <b>Table 4.</b> Values of yield ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) of lima bean inoculated with rhizobia and grown in Piauí and Ceará states. At 70 days of lima bean sowing -----   | <b>45</b> |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

*Phaseolus lunatus* L também conhecido como feijão-fava, feijão-de-lima, fava ou fava-de-lima é uma das principais espécies de leguminosas cultivadas em regiões tropicais e representa uma importante fonte alternativa de proteína para consumo humano (SILVA, 2015; GRIN, 2018). Sua capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas adversas como tolerância à seca e ao calor, possibilita seu cultivo na região Nordeste do Brasil. Nessa região, os estados do Ceará e Piauí ocupam o 1º e 5º lugar, respectivamente, em produção dessa cultura com rendimento estimado em 0,45 ton ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2018).

No entanto, sua produtividade ainda é considerada baixa (328 kg.ha<sup>-1</sup>) quando comparado ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) em virtude da falta de tecnologia, cultivares e nutrientes (SANTOS et al., 2002; IBGE, 2018). Dentre os nutrientes mais exigidos pela cultura, pode-se citar o nitrogênio, elemento essencial no processo de fotossíntese, aumento de vigor e desenvolvimento vegetal. Uma alternativa para suprir esse nutriente é a associação simbiótica realizada entre o feijão-fava e bactérias diazotróficas, comumente denominadas de rizóbios, através do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (ANTUNES et al. 2011; BARAÚNA et al., 2014; MATSUBARA e ZÚÑIGA-DÁVILA, 2015).

A FBN tem uma contribuição significativa na viabilidade econômica e ambiental dos sistemas de produção, pois reduz a necessidade de aplicação onerosa de fertilizantes nitrogenados, melhorando a qualidade do solo e rendimento das culturas (MASSAWE et al., 2016). Entretanto, alguns fatores podem influenciar a eficiência da FBN e o processo de nodulação, como, as características da planta (tamanho das sementes) e os diversos fatores edafoclimáticos (condições extremas de temperatura, salinidade, umidade e acidez, etc). (DIAS, 2017; DABESSA et al., 2018).

Das características da planta, o tamanho das sementes tem sido indicado como um fator que pode contribuir no aumento ou diminuição do processo de FBN da cultura (DOBERT e BLEVINS, 1993; SINGH e WRIGTH, 2002; ERDEMCI et al., 2017; SILVA et al., 2017). Estudos realizados por Farid and Navabi. (2015) relataram que sementes grandes apresentavam maior capacidade de nodulação que sementes pequenas.

Contudo, além dessas características, os fatores edafoclimáticos, também geram perdas significativas na associação simbiótica, tendo destaque, as altas temperaturas e a baixa umidade, pois reduzem o tamanho dos nódulos e a população de bactérias fixadoras, prejudicando o processo de FBN (VARGAS e HUNGRIA, 1997; THOMAS e COSTA, 2010).

Alguns indicadores são utilizados como usuais de nodulação, como por exemplo, o número, a biomassa e o tamanho de nódulos, além do nitrogênio acumulado nos tecidos vegetais, constituindo critérios utilizados para avaliação da simbiose rizóbios-leguminosas, fazendo parte, inclusive, do protocolo para avaliação da eficiência agrônômica de estirpes no Brasil pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) (FERREIRA & CASTRO, 1995; XAVIER et al., 2006; RUGHEIM e ABDELGANI, 2009).

Apesar dessa importância, a maioria dos trabalhos na região Nordeste com a cultura do feijão-fava tem sido relacionada com a conservação e pré-melhoramento genético, caracterização e prospecção de bactérias simbióticas (ASSUNÇÃO NETO et al., 2018; AMORIM et al., 2019). Sendo assim, tornam-se necessárias pesquisas acerca da influência dos fatores que interferem negativamente no processo de FBN e conseqüentemente no desenvolvimento e produtividade da cultura visando à seleção de estirpes eficientes no processo de FBN e competitivas por sítios de infecção nodulares.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios no crescimento, nodulação e fixação biológica do nitrogênio em diferentes genótipos de feijão-fava e o potencial dos mesmos no aumento da produtividade nos estados do Piauí e Ceará.

Neste sentido questões científicas foram construídas:

- 1) Existe diferença na capacidade de nodulação e FBN pelos isolados em diferentes genótipos de feijão-fava?
- 2) A inoculação em sementes com isolados de rizóbios em diferentes condições edafoclimáticas influencia o desenvolvimento do feijão-fava nos estados do PI e CE?

Com base no exposto, este estudo foi dividido em dois capítulos:

Capítulo 1 – O tamanho das sementes influencia os rizóbios no crescimento das plantas, nodulação e fixação de N em feijão-fava.

Capítulo 2 – A inoculação de rizóbios aumenta a produtividade do feijão-fava em solos dos estados do Piauí e Ceará.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Feijão-fava (*Phaseolus lunatus*)

O feijão-fava, também conhecido como feijão-de-lima ou fava-de-lima é considerado a segunda cultura economicamente mais importante no mundo, dentre as espécies do gênero *Phaseolus*, que é comercialmente explorada (FOFANA et al., 1999; LI et al., 2015; COSTA NETO et al., 2017; GRIN, 2018).

Sendo uma das principais leguminosas cultivadas em regiões tropicais e subtropicais, tais como Brasil, Peru, México, Estados Unidos, Oeste da África e sudeste da Ásia, destaca-se como fonte de proteínas na alimentação humana e animal (MAQUET et al., 1999; AZEVEDO et al., 2003; SILVA et al., 2014), tendo os Estados Unidos como o maior produtor mundial, utilizando inclusive cultivares de programas de melhoramento genético (VIEIRA 1992, KEE et al., 1997).

No Brasil, foram colhidas 11.828 toneladas de grãos secos, com um rendimento médio da produção de 328 quilogramas por hectare (kg/ha), em 2018, quando comparado ao mesmo gênero, fica atrás apenas do feijão comum que teve um rendimento médio de 1.027 kg/ha no mesmo ano. Desse modo, a espécie assume importância econômica e social, principalmente nos estados do Nordeste representando 95% da produção de feijão-fava, com área colhida de 35.790 ha, tendo os estados do Piauí e Ceará, rendimento estimado em 0,45 ton ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2018).

Outra característica que destaca a importância desta leguminosa, é a ampla capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, como variações de temperatura, umidade, intensidade da luz, pH do solo, nutrição do solo (SOTO et al., 2005). Essas variações nas condições ambientais têm impacto direto e indireto na diversidade de características morfológicas das plantas (GUIMARÃES, 2007; OLIVEIRA et al., 2014).

Embora apresente tais características, o feijão-fava tem uma menor distribuição e baixos índices de produtividade em relação ao gênero *Phaseolus*, como o feijão comum e isso se deve a vários fatores como a palatabilidade e o tempo de cocção mais longo, ausência de tecnologia e variedades melhoradas que ajudem a incrementar a produção e cultivo por agricultores familiares em regime de sequeiro (OLIVEIRA et al., 2014; LOPES et al., 2015; SILVA et al., 2015; ASSUNÇÃO NETO et al., 2018).

É uma espécie bastante tolerante a seca, e de alta diversidade genética, apresentando genótipos com boa adaptação em regiões de clima quente e úmido, o que possibilita uma prolongada colheita dos grãos durante o período mais seco e adequando-se bem ao sistema de agricultura familiar (SULLIVAN e DAVENPORT, 1993; GUIMARÃES, 2005; MELO, 2011).

A grande variação na morfologia, coloração e tamanho das sementes são fatores utilizados como critério para explicar a origem e a diversidade genética dessa espécie (VARGAS et al., 2003). Com base na forma e peso das sementes, os genótipos dessa cultura podem ser classificados em dois grupos principais, o mesoamericano e o andino. O grupo gênico mesoamericano apresenta sementes pequenas (tamanho variando de 30 a 78 g / 100 sementes, com uma média de cerca de 45 g / 100 sementes), que compreende os tipos: “Batata”, com sementes pequenas e globulares e “Sieva”, de sementes pequenas e planas, domesticados na região da Mesoamérica (MARTINEZ-CASTILHO et al., 2008; ANDUEZA-NOH et al., 2013). O conjunto gênico andino com sementes planas maiores conhecidas como “Lima grande” (tamanho variando de 58 a 122 g / 100 sementes, com uma média de cerca de 87 g / 100 sementes) (CASTINEIRAS et al., 1991), domesticadas nos Andes do Equador e norte do Peru (MOTTA-ALDANA et al., 2010; CHACÓN-SÁNCHEZ e MARTÍNEZ-CASTILLO, 2017).

Essa característica, tamanho da semente, tem se destacado como fator importante para a eficiência da nodulação e FBN (DOBERT e BLEVINS, 1993; KAYDAN e YAGMUR, 2008), sendo que proporcionaram maior massa seca, número de nódulos e maior acúmulo de nitrogênio (DOBERT e BLEVINS, 1993). Estudos realizados por Antunes. (2011) e Costa Neto. (2016), com inoculação de rizóbios em diferentes genótipos de feijão-fava, sob condições axênicas, obtiveram diferentes respostas da eficiência simbiótica, nodulação e FBN em decorrência do tamanho da semente.

Apesar de serem importantes, a maioria dos estudos relacionados ao feijão-fava estão voltados ao pré-melhoramento genético (ASSUNÇÃO NETO et al., 2018), bioprospecção de bactérias (AMORIM et al., 2019) e avaliação de caracteres morfológicos e agrônômicos (BARREIRO NETO et al., 2015). No entanto, pouco se sabe sobre a utilização de microrganismos eficientes em fixar nitrogênio através da FBN em diferentes tamanhos de sementes e condições edafoclimáticas.



## 2.2. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio (N) é um dos principais elementos estruturais das biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e clorofila, além de ser um elemento importante em processos metabólicos envolvidos no crescimento da planta, garantindo-lhe a sobrevivência (HUNGRIA e KASCHUK, 2014; REIS et al., 2018).

Apesar de a atmosfera terrestre ser constituída por 78% de Nitrogênio, os solos de todo o mundo apresentam baixa concentração desse elemento, principalmente nos trópicos, o que o torna um fator limitante nas atividades agrícolas (SINGHA et. al., 2018). Uma alternativa economicamente viável e ambientalmente segura para o seu fornecimento às culturas é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que representa o mais importante processo biológico para a existência da vida na Terra, após a fotossíntese (REIS JUNIOR et al., 2011).

A FBN merece destaque por ser a principal forma de entrada de nitrogênio (N) em sistemas naturais e agrícolas de subsistência, cujo processo é realizado por bactérias fixadoras, comumente denominadas diazotróficas, que são capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), transformando-o em íons amônio ( $NH_4^+$ ) que são assimiláveis pelas plantas e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídos, aminoácidos e amidas (HUNGRIA et al., 2007; FREITAS et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2016).

Dentre os microrganismos que realizam esse processo, destacam-se os rizóbios, que são um grupo especial de bactérias diazotróficas do solo, sem endósporos, 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).

Na cultura do feijão-fava, estudos tem relatado uma ampla presença de rizóbios associados a essa leguminosa como os representantes dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (PEREIRA, 2018). Apesar da comprovada preferência desta leguminosa por associar-se ao gênero *Bradyrhizobium*, ela provavelmente possui um nível de promiscuidade maior que o já conhecido (SANTOS et al., 2011; DURÁN et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2015; AMORIM et al., 2019).

Essas bactérias vivem livres no solo e, ao entrarem em contato com a leguminosa infecta uma célula interna da raiz, dando origem aos nódulos, estrutura hospedeira, que servirá de abrigo para o desenvolvimento reprodutivo e metabólico

do microrganismo. A nodulação é um sistema complexo que se inicia após a germinação quando o rizóbio está no solo ou aderido à semente. Envolve três etapas: a) pré-infecção, onde o simbiote é reconhecido e se inicia a interação entre as superfícies da bactéria e da planta; b) infecção da planta pela bactéria e formação do nódulo e c) funcionamento do nódulo e FBN (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Dentro do nódulo, ocorre a ativação do complexo enzima nitrogenase que a partir da presença da leghemoglobina passa a receber todos os açúcares necessários e em troca fornece para a planta nitrogênio (GLIESSMAN, 2005).

Para que a eficiência na simbiose ocorra é necessário um processo complexo de comunicação molecular que envolve a expressão dos genes em ambos os parceiros simbióticos (rizóbio-leguminosa). No processo de nodulação ocorre a produção de flavonoides, compostos que induzem a produção da proteína NodD em bactérias. Essas proteínas ativam genes responsáveis pela produção dos fatores Nod, moléculas produzidas pelo rizóbio e reconhecidas pela planta e que induzem a formação dos nódulos (ANDREWS & ANDREWS, 2017). Vários genes Nif com funções específicas atuam na fixação, assimilação e regulação do nitrogênio. Eles codificam proteínas essenciais, tais como a nitrogenase, que fixam e regulam o nitrogênio nas leguminosas (SATYANARAYANA et al., 2018).

Sendo assim, o número de nódulos e sua massa têm sido utilizados como parâmetros de avaliação da eficiência na capacidade de fixação de nitrogênio em feijão-fava, como já foi observado em estudos sobre a eficiência de isolados nativos de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* em *P. lunatus* (COSTA NETO et al., 2017).

Alguns fatores são determinantes para a eficiência da fixação, como por exemplo, a competitividade, especificidade, compatibilidade e efetividade do rizóbios com seu hospedeiro. (ANTUNES et. al. 2011, NAVEED et. al. 2015). Porém, essa eficiência pode ser afetada por uma série de interferências, que inclui as características da planta, o pH do solo, a disponibilidade hídrica do solo, a umidade do ar e temperaturas extremas (ARANJUELO et. al., 2014; SINGHA et. al., 2018).

Diante disso, existe a necessidade de selecionar rizóbios eficientes e com alto desempenho, incluindo boa sobrevivência, competitividade e colonização das raízes das plantas hospedeiras, apresentando capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (CALAZANS et al., 2016).

### **2.3. Influência do tamanho das sementes e das condições ambientais na eficiência da FBN**

Estudos têm sido realizados com o intuito de selecionar novos microrganismos com maior eficiência simbiótica, porém no processo de FBN, torna-se primordial avaliar a influência das respostas dos diferentes genótipos da planta hospedeira nesse processo (AKTER et al., 2014). A identificação de genótipos apresentando um alto potencial de nodulação é uma das etapas recomendadas para programas de melhoramento visando aumentar a FBN (KNUPP et al., 2017).

Para avaliação da nodulação, uma característica importante a ser considerada, é o tamanho das sementes que pode contribuir para o aumento ou diminuição do processo de FBN (DOBERT AND BLEVINS, 1993; SINGH AND WRIGHT, 2002; ERDEMCI et al., 2017). Trabalhos realizados por Farid & Navabi (2015) com feijão comum relataram que genótipos de sementes grandes, em média, tiveram aumento de 55 e 35% no peso seco e número de nódulos, respectivamente em relação aos genótipos de sementes pequenas, correlacionando-se positivamente com peso seco da parte aérea ( $P < 0.01\%$ ). De acordo com Namayanja et al. (2014) esta correlação se deve a maior capacidade fotossintética do tecido vegetal, apresentando formação de maiores nódulos na fase de floração.

Silva et al. (2017) em estudos com amendoim, observaram maiores valores de número e matéria seca dos nódulos nas sementes grandes em comparação às sementes pequenas, segundo eles estes resultados evidenciam que o tamanho das sementes exerce influência direta na formação e no tamanho dos nódulos das raízes de amendoim; sendo que as sementes grandes resultam em plantas com maior quantidade de nódulos.

De acordo com Franco et al. (2002), a eficiência de nodulação é altamente dependente do genótipo da planta. Esses autores ao estudarem diferentes genótipos de feijão observaram a superioridade relativa das cultivares de sementes grandes sobre as sementes pequenas quanto à capacidade de nodulação.

Apesar disso, ainda existem controvérsias quanto a capacidade de nodulação por diferentes genótipos, como o observado por Akter et al. (2014) que obtiveram maior nodulação em sementes pequenas em comparação com às sementes grandes, evidenciando a necessidade de mais estudos para comprovar a influência de diferentes genótipos na eficiência de nodulação.

Além das características da planta, os fatores ambientais também podem influenciar a nodulação e a capacidade de FBN das leguminosas, tais como as características do clima e do solo merecendo destaque as variações de temperatura, umidade, pH, entre outros (CHAVES, 2014; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; RUMJANEK et al., 2005).

A temperatura exerce forte influência no processo da FBN por plantas de regiões tropicais, podendo ser um fator limitante ao crescimento e desempenho do rizóbio, pois altas temperaturas (40° C) reduzem drasticamente a atividade da nitrogenase, proporcionando a formação de nódulos ineficazes, em contrapartida, baixas temperaturas reduzem a atividade microbiana para absorção do N<sub>2</sub> (HUNGRIA AND VARGAS, 2000; SAHA et al., 2017).

Esta influência pode ser observada na simbiose do feijão comum, onde tanto a planta como o rizóbio são afetados por temperaturas superiores à 34°C (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Entretanto estudos com feijão-caupi têm demonstrado uma maior tolerância de temperatura dos rizóbios e o que se observa é a capacidade destes rizóbios em tolerar temperaturas de 39° C até 42°C (XAVIER et al., 2006), deste modo, supõe-se que, dependendo da espécie essa tolerância pode variar, no entanto, mais estudos são necessários para confirmar tal observação.

Outro fator importante na limitação da FBN é a umidade, que tem sido apontada como uma das principais causas da baixa nodulação e sobrevivência das bactérias (THOMAS e COSTA, 2010). Esses resultados corroboram com os encontrados com feijão-caupi (FARIAS et al., 2016), soja (BARBOSA et al., 2017) e feijão comum (MERCANTE et al., 2017), em que a umidade também foi fator importante no desempenho dos rizóbios. Vale ressaltar, que o impacto da baixa umidade do solo sobre as bactérias depende da intensidade, da duração e do estágio de desenvolvimento das plantas (CRISTOPHE et al., 2011).

Mattos et al. (2015), em estudos sobre a nodulação e o rendimento da soja sob estresse hídrico, observaram que as estirpes constantes dos produtos comerciais, obtiveram interferência negativa na eficiência da nodulação durante a fase vegetativa. A FBN pelas leguminosas é bastante sensível ao déficit hídrico, sendo considerado um dos principais fatores que afetam a produtividade das plantas (ZHRAN, 2001). Segundo Oliveira et al. (2014), a sensibilidade do feijão-fava ao déficit hídrico no solo e as incertezas climáticas, principalmente as relacionadas às

variações pluviométricas entre anos e locais de cultivo determinam esses baixos índices de rendimento e oscilação da produção anual desta cultura.

Além dessas, a acidez do solo também é um fator limitante, sendo provocada principalmente pela alta concentração de íons  $H^+$  (RUFINI et al., 2011), sendo que o pH do solo muito baixo ou muito alto afeta significativamente a simbiose, principalmente os primeiros estágios do processo de infecção, incluindo a troca de sinais moleculares entre parceiros simbióticos e a aderência à raiz. A principal consequência no solo é a deficiência nutricional, afetando negativamente o crescimento e rendimento das culturas, especialmente em plantas que dependem exclusivamente da simbiose para adquirir o nitrogênio (HUNGRIA & STACEY, 1997; MOHAMMADI et al., 2012; BEKERE et al., 2013).

Desta forma, o conhecimento da dinâmica do rizóbio no solo pode ser utilizado estrategicamente para elaborar e melhorar o desempenho de inoculantes. E para que o processo de inoculação não seja comprometido é necessário que os bioinsumos atendam aos padrões de controle de qualidade. Portanto, o estabelecimento de parâmetros que definem a qualidade dos bioinsumos é fundamental para a padronização do produto (CASTROUX et al., 2001).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTER, Z.; PAGENI, B. B.; LUPWAYI, N. Z.; BALASUBRAMANIAN, P. M. Biological nitrogen fixation and nifH gene expression in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Canadian Journal Plant Science**, v.94, p. 203-212, 2014.

AMORIM, M.R.; ANTUNES, J.E.L.; OLIVEIRA, L.M.S.; ROCHA, S.M.B.; AQUINO, J.P.A.; FIGUEIREDO, M.V.B.; ARAÚJO A.S.F. Current knowledge and future prospects of lima bean (*Phaseolus lunatus*)-rhizobia symbiosis. **Revista Facultad de Ciências Agrárias**, v.5, p.280-288, 2019.

ARANJUELO, I.; IGOR, C. A.; MOLERO, G. Nodule performance within a changing environmental context. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 1076-1090, 2014.

ARAÚJO, A.S.F.; LOPES, A.C.A.; GOMES, R.L.F.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; ANTUNES, J.E.L.; FIGUEIREDO, M.V.B. Diversity of native rhizobianodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume research**, v.38, p.653– 657, 2015.

ASSUNÇÃO NETO, W. V. et al. Genetic diversity in *Phaseolus lunatus* L. Based on morphological seed characters. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative Washington**, v. 61, n. 61, p. 199-200, 2018.

ANDUEZA-NOH, R. H.; SERRANO-SERRANO, M.L.; CHACÓN SÁNCHEZ, M.I.; SÁNCHEZ DEL PINO, I.; CAMACHO-PÉREZ, L.; COELLO-COELLO, J.; MIJANGOS CORTES, J.; DEBOUCK, D.G.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Multiple domestications of the Mesoamerican gene pool of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): evidence from chloroplast DNA sequences. **Genetic Resources and Crop Evolution** v. 60, p.1069-1086, 2013.

ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in legume-rhizobia symbioses. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 705, 2017.

ANTUNES, J.E.L; GOMES, R.L.F; LOPES, Â.C.A; ARAÚJO, A.S.F; CARMOM, LYRA, C.P; FIGUEIREDO, M.V.B. . Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v.35, P.751–757, 2011.

AZEVEDO, J. DE N.; FRANCO, L.J.D.; ARAÚJO, R.O.C. (2003) **Composição química de sete variedades de feijão-fava**. Teresina, 4p. (Embrapa Meio-Norte: Comunicado Técnico, 152).

BARAÚNA, A. C.; SILVA, K.; PEREIRA, G. M. D.; KAMINSKI, P. E.; PERIN, L.; ZILLI, J. E. Diversity and nitrogen fixation efficiency of rhizobia isolated from nodules of *Centrolobium paraense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 296-305, 2014.

BARBOSA, L.P.; COSTA, P.F.; RIBEIRO, P.R.A.; RUFINI, M; GUIMARÃES, A.A; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency and genotypic characterization of variants of

*Bradyrhizobium* spp. in commercial inoculants for soybeans. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.41:e0160572, 2017.

BARREIRO NETO, M. et al. Características morfológicas e produtivas em acessos de feijão-Fava consorciados. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 9, n. 3, p. 23-27, 2015.

BEKERE, W.; KEBEDE, T.; DAWUD, J. Growth and Nodulation Response of Soybean (*Glycine max* L.) to Lime, *Bradyrhizobium japonicum* and Nitrogen Fertilizer in Acid Soil at Melko, South Western Ethiopia. **International Journal of Soil Science**, v.8, n.1, p. 25-31, 2013.

CALAZANS, G.M; OLIVEIRA, C.A; CRUZ, J.C; MATRANGOLO, W.J.R; MARRIEL, I.E. Selection of efficient rhizobial symbionts for *Cratylia argentea* in the cerrado biome. **Ciencia Rural**, v.46, n.9, p.1594-1600, 2016.

CASTROUX, G.; HARTMANN, A.; REVELLIN, C. Tendências na produção e uso de inoculantes rizobiais. **Solo da planta**, v.230, p.21-30, 2001.

CHACÓN-SÁNCHEZ, M.I; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Testing Domestication Scenarios of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mesoamerica: Insights from Genome-Wide Genetic Markers. **Frontiers in Plant Science**, v.12, p. 1-20, 2017.

CHAVES, J. S. **Isolamento, caracterização e eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de Estilosantes (*Stylosanthes ssp.*)**. 2014. 75p. Dissertação de mestrado (mestrado em agronomia) - Universidade federal de Roraima, 2014.

COSTA NETO, V.P. **Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em feijão-fava inoculado com rizóbios isolados de solos da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense**. 2016. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

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, p. 117-124, 2017.

CHRISTOPHE, S.; CHISTOPHE, A.J.; ANNABELLE, L.; ALAIN, O.; MARION, P.; SOPHIE, V.A. Plant N fluxes and modulation by nitrogen, heat and water stresses: a review based comparison of legumes and non-legume plants. In: Shanker, A. Venkateswarlu, B. (Eds), **Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and adaptation**. Croatia, 2011.

DABESSA, A.; ABEBE, Z.; BEKELE, S. Limitations and strategies to enhance biological nitrogen fixation in sub-humid tropics of Western Ethiopia. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 10, n. 7, p. 122-131, 2018.

DIAS, P. A. S. **Potencial genético de linhagens elite de feijoeiro-comum para fixação biológica de nitrogênio**. 2017. 111f. Tese (Doutorado em Genética e

Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

DOBERT, R.C.; BLEVINS, D.G. Effect of seed size and plant growth on nodulation and nodule development in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Plant and soil**. V. 148, p.11-19, 1993.

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

ERDEMCI, I.; AKTAŞ, H.; NADEEM, M. A. Effect of fertilization and seed size on nodulation, yield and yield components of Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 15, p.563-571, 2017.

FARIAS, T.P.; SOARES, B.L.; ARAÚJO, A.R.A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency of rhizobia strains with cowpea in Southern Maranhão. **Revista Caatinga**, v. 29, p.611-618, 2016.

FARID, M.; NAVABI, A. N<sub>2</sub> fixation ability of different dry bean genotypes. **Canadian Journal Plant Science**, v.95, p.1243-1257, 2015.

FERREIRA, E.M.; CASTRO, I.V. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. **Soil Biology & Biochemistry**, v.27, p.1177–1183, 1995.

FIGUEIREDO, M. D. V. B.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C.; DE ARAUJO, F. F.; STAMFORD, N. P. Beneficial microorganisms: Current challenge to increase crop performance. In: **Bioformulations: for Sustainable Agriculture**. Springer, New Delhi, p. 53-70, 2016.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S.; SILVA, A.F.; CARVALHO, R. Fixação Biológica do Nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, v.8, p.585-597, 2015.

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

FOFANA, B.; BAUDOIN, J.P.; VEKEMANS, X.; DEBOUCK, D.G.; DU JARDIN P. Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**. 98, p.202–212, 1999.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 3. ed. UFRGS. Porto Alegre, 2005. 653p.



GRIN - **Germplasm Resources Information Network**. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em: <[http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax\\_search.pl?language=pt](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl?language=pt)>. Acesso em 2018.

GUIMARÃES, W. N. R. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) da Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE**. 74f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

GUIMARÃES, W. N. R.; MARTINS, L. S. S.; SILVA, E. F. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v. 11, n. 1, p. 37-45, 2007.

HUNGRIA, M; VARGAS, M.A . Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n.2, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A Importância do Processo de Fixação Biológica de Nitrogênio para a Cultura da Soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina, Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; KASCHUK, G. Regulation of N<sub>2</sub> fixation and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation in nodulated and N- fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.98, p.32- 39, 2014.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5-6, p.519-830, 1997.

**IBGE (2018)**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>, Acessado em: 15 de Fevereiro de 2020.

KNUPP, A. M.; FERREIRA, E. P. B.; ARAÚJO, A. P. Variability of nodulation traits in Andean and Mesoamerican common bean gene pools. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 4, p.252-260, abr. 2017.

KAYDAN D.; YAGMUR M. Germination, seedling growth and relative water content of shoot in different seed sizes of triticale under osmotic stress of water and NaCl. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p.2862–2868, 2008.

KEE, E.; GLANCEY, J. L.; WOOTTEN, T. L. The lima bean: a vegetable crop for processing. **Hort Technology**, Alexandria, v. 7, p. 119-128, 1997.

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 Molecular Science**, v.16, n.7, p.15172–15187, 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.

MAQUET, A.; VEKEMANS, X.; BAUDOIN, J. P. Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. ***Plant Systematics and Evolution***, v. 218, p. 43-54, 1999.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P.; ZIZUMBO VILLARREAL, D. Genetic erosion and in situ conservation of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in its Mesoamerican diversity center. ***Genetic Resources and Crop Evolution***, v.55, n.7, p.1065-1077, 2008.

MASSAWE, P.I.; MTEI, K.M; MUNISHI, L.K; NDAKIDEMI, P.A. Effect of Rhizobium and Intercropping Systems on Soil Nutrients and Biological Nitrogen Fixation as Influenced by Legumes (*Phaseolus vulgaris* and *Dolichos lablab*). ***International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences***, v.5, n.10, p.135-149, 2016.

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, p.1803–1808, 2015.

MATTOS, M. L. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; SCIVITTARO, W. B.; GALARZ, L. A.; MALDANER, E. T. Nodulação e rendimento de soja sob estresse hídrico no agroecossistema terras baixas. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO**, 9., 2015, Pelotas, RS. Anais... Pelotas: SOSBAI, 2015.

MELO, F. L. **Divergência genética em subamostras de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) por meio de marcadores agromorfológicos e microssatélites**. 106f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2011.

MERCANTE, F.M.; OTSUBO, A.A.; BRITO, O.R. New Native Rhizobia Strains for Inoculation of Common Bean in the Brazilian Savanna. ***Revista Brasileira de Ciência do Solo***, v.41,e0150120, 2017.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. ***Microbiologia e bioquímica do solo***. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOHAMMADI, K; SOHRABI, Y; HEIDAR, G; KHALESRO, S; MAJIDI, M. Effective factors on biological nitrogen fixation. ***African Journal of Agricultural Research***, v. 7, n.12, p.1782-1788, 2012.

MOTTA-ALDANA, J.R.; SERRANO-SERRANO, M.L.; HERNÁNDEZ-TORRES, J.; CASTILLO-VILLAMIZAR, G.; E DEBOUCK, D.G. Múltiplas origens de variedades locais de feijão-de-lima nas Américas: evidências do cloroplasto e polimorfismos de DNA nuclear. ***Crop Science***, v. 50, 1773–1787, 2010.

NAMAYANJA, A.; SEMOKA, J.; BURUCHARA, R.; NCHIMBI, S.; WASWA, M. Genotypic variation for tolerance to low soil phosphorous in common bean under controlled screen house conditions. **Agricultural Sciences**, v.5, p.270-285, 2014.

NAVEED, M.; MEHBOOB, I.; HUSSAIN, M. B.; ZAHIR, Z. A. Perspectives of rhizobial inoculation for sustainable crop production. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. Springer, New Delhi, p. 209-239, 2015.

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**, v. 01, p. 143-152, 2014.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; DÁVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of nitrogen-fixing nodule bacteria associated with lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in its domestication centers. In: **Phaseolus lunatus : diversity, growth and production**. New York: Nova Science, v. 1, n. 1, p. 91–102. 2015.

PEREIRA, C.S. **Caracterização polifásica de comunidade bacteriana simbiote e endofítica presentes em nódulos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. 2018. 56f. Dissertação (mestrado em genética e melhoramento)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 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.

REIS, V.R.R.; SOUZA, L.R.S.; VIEIRA, G.L.S.V.; COELHO, K.B.S.; CARMO FILHO, A.S.; SILVA, M.; R.M. Crescimento vegetativo do feijão-caupi com inoculante alternativo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.13, n. 4, p. 466-471, 2018.

REIS JUNIOR, F. B .de.; MENDES, I de. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE. S. R. M de. JUNIOR REIS, F. B dos.(Ed). **Bioteecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1. ed. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, cap. 9, p. 247-282, 2011.

RUFINI, M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; OLIVEIRA, D. P.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n.1, p.81-88, 2011.

RUGHEIM, A. M. E.; ABDELGANI, M. E. Effects of *Rhizobium* and *Bacillus Megatherium* var. *phosphaticum* strains and chemical fertilizers on symbiotic

properties and yield of Faba Bean (*Vicia faba* L.). **Advances in Environmental Biology**, v. 3, n. 3, p. 337-346, 2009.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. A ixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 280-335, 2005.

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

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

SAHA, B.; SAHA, S.; DAS, A.; BHATTACHARYYA, P.K.; BASAK, N.; SINHA, A.K.; PODDAR, P. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture. In **Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture**, p. 81-128, 2017.

SATYANARAYANA, S.D.V.; KRISHNA, M.S.R.; KUMAR, P.P.; JEEREDDY, S. In silico structural homology modeling of nif A protein of rhizobial strains in selective legume plants. **Jornal de Engenharia Genética e Biotecnologia**, v.16, p. 731-737, 2018.

SILVA, J.A.; OLIVEIRA, M.G.; SOUZA, L.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.A.; MICHEREFF, S.J. Reação de genótipos de feijão-fava a *Sclerotium rolfsii*. **Horticultura Brasileira**, v.32, p.98-101, 2014.

SILVA, N.O. **Estudos genéticos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) visando o melhoramento genético da cultura**. Dissertação (mestrado em genética e melhoramento de plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2015.

SILVA, V. B.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; DIAS, C. D. S.; SILVA, R. N. O. Crescimento inicial de *Phaseolus lunatus* L. submetido a diferentes substratos orgânicos e aplicação foliar de urina de vaca. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 1, p. 131-135, 2015.

SILVA, E. R. S.; BUSH, A.; ZUFFO, A. M.; STEINER, F. Coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum* brasileiro em sementes de amendoim de diferentes tamanhos. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 4, Suplemento 1, p. 93-102, 2017.

SINGHA, B.; MAZUMDER, P.B.; PANDEY, P. Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobia from Root Nodule of Two Legume Species Cultivated in Assam, India. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 88, n. 3, p. 1007-1016, 2018.

SINGH, G.; WRIGHT, D. Effects of herbicides on nodulation and growth of two varieties of pea (*Pisum sativum*). **Acta Agronomica Hungarica**, v.50, n.3, p.337-348, 2002.

SOTO, J. L. L.; CORRAL, J. A. R.; GONZÁLEZ, J. J. S.; ILDEFONSO, R. L. Adaptación Climática de 25 Especies de Frijol Silvestre (*Phaseolus spp.*) en la República Mexicana. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 28, n. 3, p. 211-230, 2005.

SULLIVAN, G. H.; DAVENPORT, L. R. In: JANICK, J.; SIMON, E. J. E. eds. Dry edible beans: a new crop opportunity for the east north central region. **New York, Wiley**, p. 585-588, 1993.

THOMAS, A. L.; COSTA, J. A. Desenvolvimento da planta de soja e potencial de rendimento de grãos. In: THOMAS, A. L., COSTA, J. A. (Org.). **Soja: manejo para alta produtividade de grãos**. Porto Alegre: Evangraf, 2010.

VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Fixação biológica do N<sub>2</sub> na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., eds. Biologia dos solos de cerrados. Planaltina, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, p.297-360, 1997.

VARGAS, E.M.; CASTRO, E.; MACAYA, G.; ROCHA, O. J. Variación del tamaño de frutos y semillas en 38 poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) del Valle Central de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v.51, n.3, p.707-724, 2003.

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

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

ZAHRAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.91, n.23, p. 143-153, 2001.

## **CAPÍTULO I- Seed size influences the promoting activity of rhizobia on plant growth, nodulation and N fixation in lima bean**

### **Abstract:**

This study evaluated the activity of rhizobia isolates inoculated in large and small seeds on lima bean growth, nodulation and N fixation. Selected rhizobia isolates were compared with a reference strain CIAT899 and two controls without inoculation. Large seeds contributed for highest plant growth, nodulation and N fixation than small seeds. The isolates UFPI-59, UFPI-18 and UFPI-38 promoted the highest values of shoot and root dry weight, respectively. The isolates UFPI-32 promoted the highest values of nodule number, while UFPI-59 promoted the highest values of nodule dry weight. The isolates UFPI-38 and UFPI-59 promoted the highest accumulation of N. This study showed that seed size really influences lima bean growth, nodulation and BNF. Considering rhizobia isolates, UFPI-59, UFPI-38, and UFPI-18 contributed for plant growth, promoted better nodulation and effectiveness on biological N fixation.

**Keywords:** *Phaseolus lunatus*, N-fixers, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, plant-microbes interaction

### **1. Introduction**

Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an important crop for several countries, such as Peru, Colombia, Mexico, USA and Brazil (AMORIM et al., 2019). In Brazil, it is cultivated in the Northeastern region, mainly by small farmers, in an estimated area around 37,500 ha. The main characteristics of lima bean are the high rusticity and tolerance to abiotic factors, such as drought and high temperature (ARAÚJO et al., 2017).

Although important for small farmers, lima bean still has low productivity and some reasons contribute to this situation, such as the absence of commercial varieties and low availability of nutrients, mainly nitrogen (N). Nitrogen is essential to plants and its supply to lima bean could contribute for increasing the yield (LOPES et al., 2015). Importantly, lima bean can associate with N-fixing rhizobia and through biological N fixation (BNF) uptake N for its growth and yield (AMORIM et al., 2019).

However, the efficiency of the BNF varies according to the rhizobia strains and the selection of efficient rhizobia become an important step before recommendation

to seed inoculation (IRISARRI et al., 2019). Several strains of rhizobia are already recommended for different legumes species, such as soybean (MERKEB et al., 2016), and cowpea (BATISTA et al., 2017). So far, lima bean does not have any recommended rhizobia for inoculation and some previous studies have reported potential rhizobia isolates (ANTUNES et al, 2011; COSTA NETO et al, 2017). However, these studies were not conducted in soils, but under axenic conditions. Thus, it is necessary to advance the studies for selecting rhizobia under soil conditions.

Plant traits also influence nodulation and BNF in legumes. Among these traits, seed size contributes for increasing or decreasing the process of N fixation (DOBERT AND BLEVINS, 1993; SINGH AND WRIGHT, 2002; ERDEMCI et al., 2017). According to Erdemci et al. (2017) seed size influences seedling vigor and plant growth and large seeds usually produce more vigorous seedlings than small ones. In a previous study with *Pisum sativum*, Singh and Wright. (2002) found that large seeds had a higher increase in nodulation than small ones. In lima bean, Dobert and Blevins. (1993) found a positive correlation between seed size and nodulation. However, they did not evaluate the correlation between seeds size and rhizobia on plant growth and BNF. Thus, it remains unclear how are the interaction between rhizobia in seed size on plant growth, nodulation, and BNF of lima bean. The aim of this study was to evaluate the influence of seed size in promoting the activity of rhizobia on plant growth, nodulation and BNF in lima bean.

## 2. Materials and methods

The study was conducted in a greenhouse located at the Agricultural Science Center, Federal University of Piauí, Brazil, from January to March 2019. A sandy soil was used in this study and it was collected at 0-20 cm depth. The soil presented the following physical and chemical properties: sand – 832 g kg<sup>-1</sup>, silt – 64 g kg<sup>-1</sup>, clay - 104 g kg<sup>-1</sup>, pH – 6.2, organic matter – 0.57 g kg<sup>-1</sup>, P – 1.8 mg kg<sup>-1</sup>, K – 38.9 mg kg<sup>-1</sup>, Ca – 1.06 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> and Mg – 0.3 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>.

For the experiment, five rhizobia isolates, selected according to their high efficiency under axenic condition (ANTUNES et al., 2011), were inoculated in small (genotype UFPI-1120; 11 mm and 350 mg of diameter and dry weight) and large (genotype UFPI-480; 18 mm and 800 mg of diameter and dry weight) seeds of lima

bean (*Phaseolus lunatus* L). The isolates were: UFPI-18 (*Enterobacter* sp.), UFPI-32 (*Bradyrhizobium* sp.), UFPI-38 (*Rhizobium* sp.), UFPI-50 (*Bradyrhizobium* sp.), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium* sp.). These isolates were compared against a reference strain to *Phaseolus* (CIAT 899 - *Rhizobium tropici*; Florentino et al., 2018), and two controls without inoculation: negative (NC; without N fertilization) and positive (PC; with N fertilization).

The isolates were grown in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid culture broth (under orbital shaking at 200 rpm, 28 °C, 72 h). The bacterial growth was verified through a spectrophotometer (wavelength of 540 nm) considering a final concentration of  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>. The experimental unit consisted of 64 pots (diameter 18 cm, length 16 cm) filled with 5 kg of soil (previously air-dried at room temperature and sieved in a 2 mm mesh). Before inoculation, seeds were disinfected with alcohol (70%) for 30 seconds and sodium hypochlorite (2%) for 60 seconds, being washed five times with sterile distilled water. Five seeds were sowed per pot and each one was directly inoculated with 1 mL of the suspension containing the rhizobia. The positive control (+N) received 50 mg N per pot, in accordance with N requirement by lima bean. Five days after germination, plants were thinned, leaving one plant per pot. Pots were irrigated daily with sterilized water to maintain soil moisture at 80% of field capacity.

The experiment was harvested 45 days after sowing (flowering stage). Plants were excised at the cotyledonal node to separate shoots from roots. Nodules were separated from the roots and counted to determine nodule number (NN). Afterward, nodules, shoots and roots were dried (65°C; 72 h) and weighed to determine nodules (NDW), shoot (SDW), and roots (RDW) dry weight. Total N content in shoot was estimated by Kjeldahl method and the accumulation of N (AcN) in shoot was estimated by the shoot dry matter. The effectiveness of BNF was estimated comparing the inoculated treatments against negative control, being the values expressed in %, according to the expression proposed by FARIA and FRANCO (2002): Effectiveness =  $(SDW_i / SDW_{ni}) \times 100$ , in which  $SDW_i$  and  $SDW_{ni}$  are the values of shoot dry weight found in inoculated and non-inoculated plants, respectively.

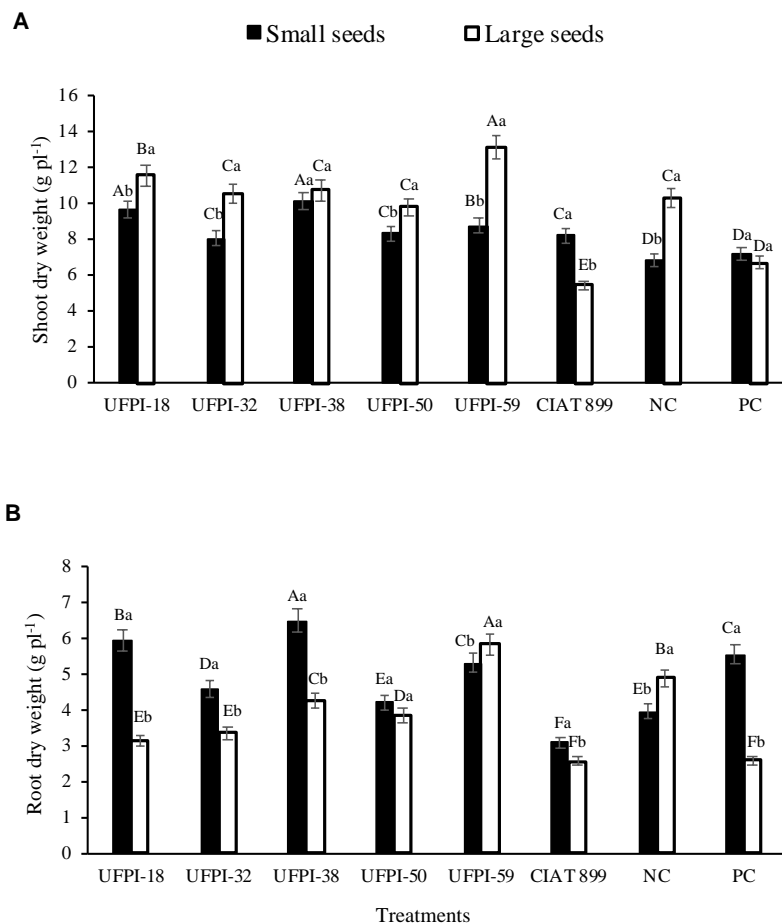
The treatments were arranged in a randomized design, under an 8 x 2 factorial scheme with four replications, corresponding to eight treatments (rhizobia and controls) and two seed sizes (small and large). The normality of data was analyzed



by using the test of Shapiro-Wilk. Afterward, data were statistically analyzed by using ANOVA, and the means were compared using Scott-Knott test ( $p \leq 0.05\%$ ) through the statistical program SISVAR, version 5.6 (FERREIRA, 2014). In addition, to compare the isolate profiles we conducted a principal component analysis biplot (PCA) based on the determined characteristics. For this, the data matrix was initially analyzed using detrended correspondent analysis (DCA) to evaluate the distribution of the data, which indicated the best-fit model PCA. Then, PCA plots were generated using the Canoco 4.5 software (BIOMETRICS, WAGENINGEN, THE NETHERLANDS).

### 3. Results

Treatments, seed size and interactions between treatments and seed size significantly influenced all variables. In general, the values of SDW were highest with large seeds than small ones (Figure 1A). The exception was CIAT899 that showed the highest SDW with small seeds.

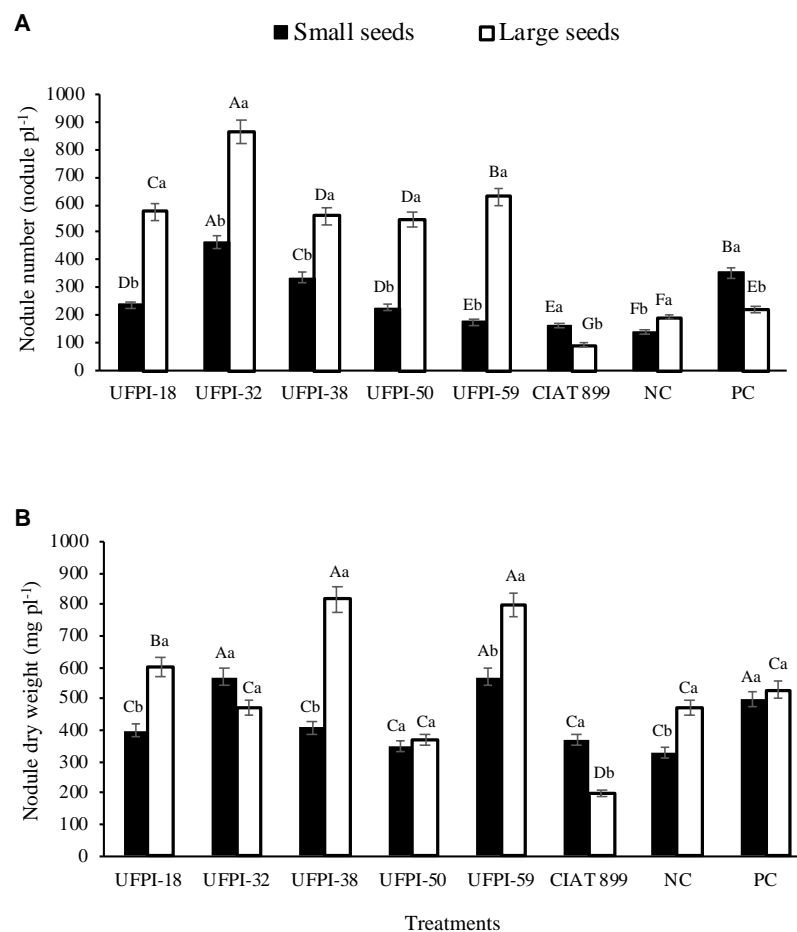


**Figure. 1** Shoot (A) and root (B) dry weight of lima bean inoculated with rhizobia isolates in small and large seeds. Similar lower case letters comparing seeds sizes for the same treatment, and capital letters comparing treatments for the same seeds size do not differ significantly by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). \*UFPI-18 (*Enterobacter sp.*), UFPI-32 (*Bradyrhizobium sp.*), UFPI-38 (*Rhizobium sp.*), UFPI-50 (*Bradyrhizobium sp.*), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium sp.*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), NC (negative control), PC (positive control).

For this plant parameter, UFPI-59 promoted the highest values when inoculated in large seeds. For small seeds, UFPI-18 and UFPI-38 promoted the highest values of SDW. In contrast, the values of RDW were highest with small seeds (Figure 1B).

The exception was UFPI-59 and NC that promoted the highest RDW with large seeds. For this plant parameter, UFPI-38 and UFPI-59 promoted the highest values, when inoculated in large and small seeds, respectively. Interestingly, UFPI-38 and UFPI-59, in small and large seeds, respectively, increased the plant growth when compared to NC, PC and CIAT899.

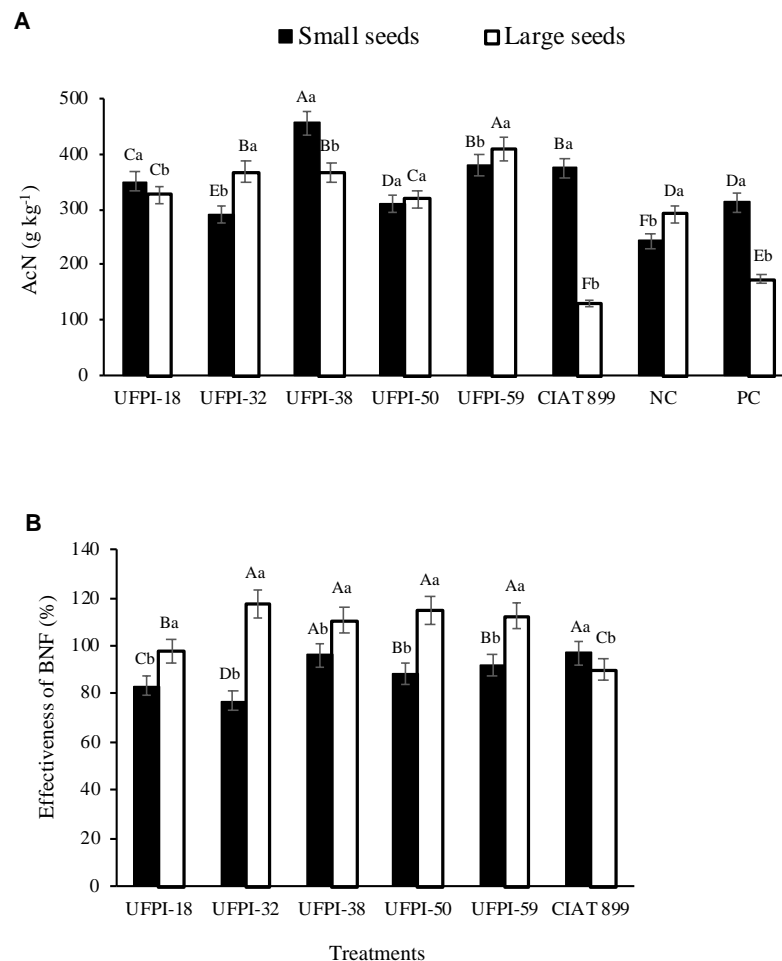
The values of NN and NDW were highest with large seeds (Figure 2).



**Figure. 2** Nodule number (A) and nodule dry weight (B) in lima bean inoculated with rhizobia isolates in small and large seeds. Similar lower case letters comparing seeds sizes for the same treatment, and capital letters comparing treatments for the same seeds size do not differ significantly by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). \*UFPI-18 (*Enterobacter sp.*), UFPI-32 (*Bradyrhizobium sp.*), UFPI-38 (*Rhizobium sp.*), UFPI-50 (*Bradyrhizobium sp.*), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium sp.*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), NC (negative control), PC (positive control).

The exception was CIAT899 and NC, for NN, and CIAT899 and UFPI-32, for NDW, that presented the highest values with small seeds. The isolates UFPI-32 and UFPI-59 increased NN and NDW, respectively, when inoculated in both large and small seeds (Figure 2).

The highest values of AcN were found with small seeds in the treatments UFPI-18, UFPI-38, CIAT899 and PC (Figure 3A).

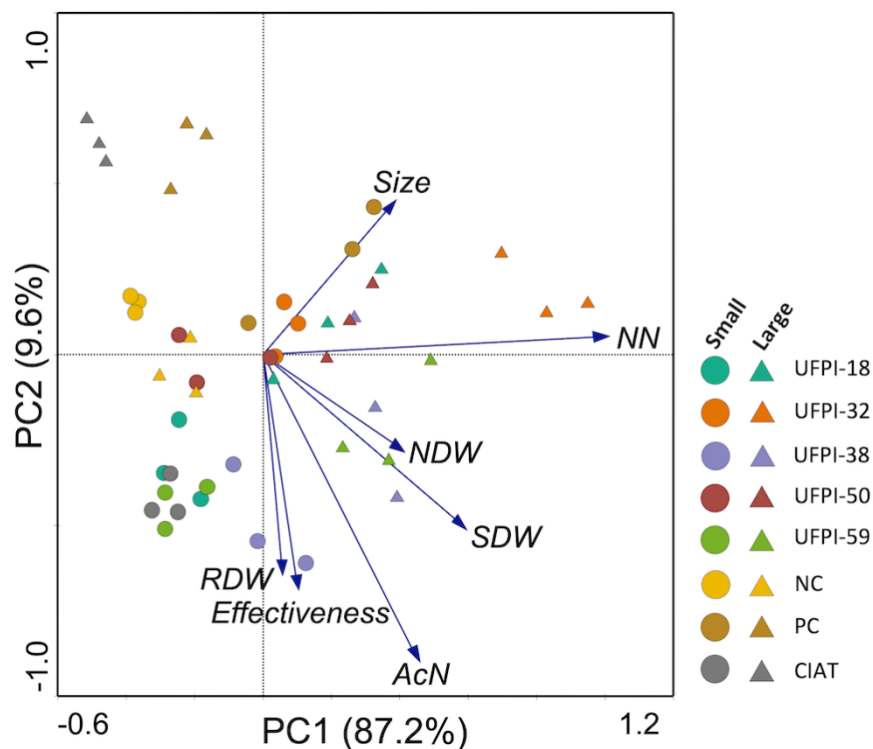


**Figure. 3** Accumulated N (A) and effectiveness (B) in lima bean inoculated with rhizobia isolates in small and large seeds. Similar lower case letters comparing seeds sizes for the same treatment, and capital letters comparing treatments for the same seeds size do not differ significantly by the Tukey

test ( $p < 0.05$ ). \*UFPI-18 (*Enterobacter sp.*), UFPI-32 (*Bradyrhizobium sp.*), UFPI-38 (*Rhizobium sp.*), UFPI-50 (*Bradyrhizobium sp.*), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium sp.*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), NC (negative control), PC (positive control).

The isolates UFPI-38 and UFPI-59 promoted the highest AcN when inoculated in both large and small seeds (Figure 3A). In addition, these isolates promoted higher AcN than PC. However, UFPI-38 presented the highest effectiveness when inoculated in both large and small seeds, while UFPI-59 presented the highest values when inoculated in small seeds (Figure 3B).

The PCA showed the relationship between treatments and the evaluated parameters, according to seeds size (Figure 4).



**Figure. 4** Principal component analysis biplot (PCA) based on the treatments\* and the evaluated parameters (NN -Nodule number; NDW-nodule dry weight, SDW-shoot dry weight, RDW-root dry weight, AcN- Accumulated N, effectiveness) in relation to seeds size. The significance of treatments on related parameters are indicated by the arrows. \*UFPI-18 (*Enterobacter sp.*), UFPI-32 (*Bradyrhizobium sp.*), UFPI-38 (*Rhizobium sp.*), UFPI-50 (*Bradyrhizobium sp.*), and UFPI-59 (*Bradyrhizobium sp.*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), NC (negative control), PC (positive control).

This analysis explained 96.8 % of the total variation of which 87.2% and 9.6% are displayed on the horizontal and vertical axes, respectively. Large seeds inoculated with rhizobia correlated with the plant and nodules parameters than small

ones. The exception was the treatments NC, PC and CIAT899. Thus, when large seeds were inoculated, isolates UFPI-38 and UFPI-59 correlated with SDW, AcN, NDW and effectiveness, while UFPI-32 correlated with NN.

#### 4. Discussion

The results showed that lima bean growth, nodulation and BNF varied according to rhizobia. These results are in line with previous studies that showed differences on nodulation and symbiotic efficiency by rhizobia in soybean (BARBOSA et al., 2017) and common bean (MERCANTE et al., 2017). In addition, the results showed that, in sandy soil with low fertility, the inoculation in lima bean should be strongly recommended. In general, the inoculation of UFPI-59, UFPI-18 and UFPI-38 promoted the highest plant growth, when inoculated in large and small seeds, as compared with NC, PC and CIAT899. The plant growth, i.e. shoots and roots dry weight, is an important parameter for selecting rhizobia to inoculation. Thus, these isolates present potential for further studies in field and recommendation as inoculant.

The nodulation, i.e. nodule number and dry weight, differed between rhizobia and seed size. The inoculation of UFPI-32 stimulated the nodule number, while that UFPI-59 increased the nodule biomass. Although nodule number has been stimulated by inoculation of UFPI-32, this isolate did not stimulate the nodule growth as compared to UFPI-59. According to Ogutcu et al. (2010), nodule dry weight is more reliable than nodule number as indicator of effective symbiosis since larger nodules fix more N than smaller ones. Therefore, UFPI-59 presents high potential for increasing the lima bean growth and nodulation. According to Parra-Colmenares and Kahn. (2005), nodulation and plant growth are key parameters commonly used to estimate the potential of rhizobia. In a previous study, the isolate UFPI-59 also promoted higher nodule biomass in lima bean under axenic condition (ANTUNES et al., 2011). Thus, the results suggest that this isolate is also effective under soil condition.

The nodulation observed in uninoculated plants (NC and PC) suggests the presence of native rhizobia nodulating lima bean. However, these native rhizobia were not more effective than the isolates. The results showed that CIAT899 presented highest nodulation in small seeds and it confirms the recommendation of this strain for *Phaseolus vulgaris* (common bean) which presents small seeds.

The isolate UFPI-59, that promoted highest nodule biomass, contributed to higher accumulation of N by lima bean. However, the isolate UFPI-38, that did not present highest nodulation, also contributed to higher accumulation of N. Although UFPI-38 did not present high nodulation, this isolate promoted higher root growth and it can be contributed to the high N uptake due to the increased root surface. In addition, UFPI-38 presents urease activity (CHIBEBA et al., 2020) and it can provide greater efficiency in the use of N by the plants (MOBLEY AND HAUSINGER, 1989). The results have shown that the inoculation of UFPI-59 and UFPI-38 potentially increased plant growth, nodulation and N fixation independent of seeds size. This finding agrees with Antunes et al. (2011) who found a strong response of UFPI-59 on nodulation and accumulation of N in lima bean under axenic conditions. Usually, higher nodule biomass increases the accumulation of N in plants (HAMAWAKI AND KANTARTZI, 2018). Also, the isolate UFPI-59 presents protease activity and the capability of solubilize P (CHIBEBA et al., 2020), being two important biochemical properties to increase plant growth. Thus, both isolates can be selected as potential for increasing N fixation and contributing for lima bean growth.

The multivariate analysis (PCA) showed differences between large and small seeds on all parameters. It confirms the variation found on plant growth, nodulation and BNF according to seeds size. The results confirm UFPI-38 and UFPI-59 as more efficient rhizobia, mainly with large seeds. In addition, the highest values of parameters were found in large seeds and it agrees with previous studies assessing the effect of seed size on plant growth and nodulation (DOBERT AND BLEVINS 1993; SINGH AND WRIGHT, 2002; ERDEMCI et al, 2017). Since large seeds present higher reserve content, it could promote faster emergence and more vigorous seedling (SINGH AND WRIGHT, 2002). Although this study did not evaluate seedling emergence and vigor, these factors may have contributed for highest plant growth and nodulation. Indeed, Dobert and Blevins. (1993) have reported an influence of seed-factors on lima bean nodulation.

Since the lima bean presents importance mainly to smallholders who use different types of seeds (PENHA et al., 2017), this study brings important information regarding to the potential rhizobia isolate to be inoculated in small or large seeds. In addition, the practice of inoculation is important to lima bean since this crop presents low yield yet and, at the same time, it can contribute for decreasing the dependency of N fertilizers and increasing the environmental sustainability.

## 5. Conclusions

Seed size influences plant growth, nodulation and BNF, being a key trait to determine the success for inoculation in lima bean. Thus, large seeds contributed with better lima bean performance on all evaluated parameters. Considering rhizobia isolates, UFPI-59 and UFPI-38 contributed for plant growth, nodulation and BNF. Therefore, these isolates present high potential for evaluation under field experiments.

## 6. References

- AMORIM, M.R.; ANTUNES, J.E.L.; OLIVEIRA, L.M.S.; ROCHA, S.M.B.; AQUINO, J.P.A.; FIGUEIREDO, M.V.B.; ARAÚJO, A.S.F. Current knowledge and future prospects of lima bean (*Phaseolus lunatus*)-rhizobia symbiosis. **Revista Facultad de Ciências Agrárias**, v.51, n.2, p.280-288, 2019.
- ANTUNES, J.E.L.; GOMES, R.L.F.; LOPES, Â.C.A.; ARAÚJO, A.S.F.; CARMOM, LYRA, C.P.; FIGUEIREDO, M.V.B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v.35, P.751–757, 2011.
- ARAÚJO, A.S.F.; LOPES, A.C.A.; 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, p.7-14, 2017.
- BARBOSA, L.P.; COSTA, P.F.; RIBEIRO, P.R.A.; RUFINI, M.; GUIMARÃES, A.A & MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency and genotypic characterization of variants of *Bradyrhizobium* spp. in commercial inoculants for soybeans. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 41:e0160572, 2017.
- BATISTA, E.R.; GUIMARÃES, S.L.; BONFIM-SILVA, E.M & SOUZA, C.P.A. Combined inoculation of rhizobia on the cowpea development in the soil of Cerrado. **Revista Ciência Agrônômica**, 48:745-755, 2017.
- 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**, 73:117-124, 2017.
- CHIBEBA, A.M.; PEREIRA, C.S.; ANTUNES, J.E.L.; RIBEIRO, R.A.; LOPES, A.C.A.; GOMES, R.L.F.; HUNGRIA, M & ARAÚJO, A.S.F. Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. **Symbiosis**, 80:279-292, 2020
- DOBERT, R.C.; BLEVINS, D.G. Effect of seed size and plant growth on nodulation and nodule development in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Plant and Soil**, v.148, p.11-19, 1993.

ERDEMCI, I.; AKTAŞ, H.;NADEEM, M. A. Effect of fertilization and seed size on nodulation, yield and yield components of Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 15, p.563-571, 2017.

FARIA, S.M.; FRANCO, A.A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Documentos, 158).

FERREIRA, D. F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n. 2, p.109-112, 2014.

FLORENTINO, L.A.; F. JUNIOR, K.S.; , P. FILHO, M.V.; OLIVEIRA, T.E.; SOUZA, F.R.C.; SILVA, A.B. Inoculação e aplicação de diferentes doses de nitrogênio na cultura do feijoeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, n.4, p.963-970, 2018.

HAMAWAKI, R.L.; KANTARTZI, S.K. Di-nitrogen fixation at the early and late growth stages of soybean. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.40, e36372, 2018.

IRISARRI ,P.; CARDOZO, G.; TARTAGLIA, C.; REYNO, R.; GUTIÉRREZ , P.; FERNANDO A. LATTANZI, F.A.; REBUFFO, M.ª MONZA, J. Selection of competitive and efficient rhizobia strains for white clover. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.768, 2019.

MERCANTE, F.M.; OTSUBO, A.A.; BRITO, O.R.. New Native Rhizobia Strains for Inoculation of Common Bean in the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.41, e0150120, 2017.

MERKEB, F.; REDI, M.; GEBREMEDHIN, W. Evaluation of different commercial rhizobial strains on soybean (*Glycine max* L.) yield at Pawe District, Northwestern Ethiopia. **World Scientific News**, v. 55, p. 15-26, 2016.

MOBLEY, H. L. T.; HAUSINGER, R. P. Microbiol Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization. **Microbiology Review**, v. 53, n. 1, p. 85-108, 1989.

ÖĞÜTÇÜ, H.; KASIMOĞLU, C.; ELKOCA, E. Effects of rhizobium strains isolated from wild chickpeas on the growth and symbiotic performance of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) under salt stress. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.34, p.361-371, 2010.

PARRA-COLMENARES, A.; KAHN, M.L. Determination of nitrogen fixation effectiveness in selected *Medicago truncatula* isolates by measuring nitrogen isotope incorporation into pheophytin. **Plant and Soil**, v.270, p.159–168, 2005.

PENHA, J.S.; LOPES, A.C.A.; GOMES, R.L.F.; PINHEIRO, J.B.; ASSUNÇÃO FILHO, J.R.; SILVESTRE, E.A.; VIANA, J.P.G.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Estimation of natural outcrossing rate and genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L. var. *lunatus*) from Brazil using SSR markers: implications for conservation and breeding. **Genetic Resource and Crop Evolution**, v.64, p.1355-1364, 2017.



SINGH, G.; WRIGHT, D. Effects of herbicides on nodulation and growth of two varieties of pea (*Pisum sativum*). **Acta Agronomica Hungarica**, v.50, n.3, p.337-348, 2002.

## **CAPÍTULO II - Inoculation of rhizobia increases lima bean (*Phaseolus lunatus*) yield in soils from Piauí and Ceará states, Brazil.**

### **Abstract**

The inoculation of rhizobia in lima bean can increase its yield and contribute to smallholder farms. In this study, the potential of rhizobia in increasing the lima bean yield was evaluated in two regions from Piauí and Ceará states. The experiments were conducted in field comparing three rhizobia strains (UFPI-32, UFPI-38, UFPI-59), one strain of reference to *Phaseolus vulgaris* (CIAT 899) and two controls (with and without nitrogen). The parameters of nodulation, N accumulation and yield varied between treatments and locations. The nodule biomasses were higher in UFPI-59 and UFPI-32 (Piauí), and CIAT 899 and UFPI-32 (Ceará). The highest values of nodule size were found in treatments UFPI-59 in both locations. Lima bean presented highest values of leaf N in UFPI-59 and CIAT 899. The highest values of grain yield were found in the treatment UFPI-59 as compared to CIAT 899 and the controls. The results confirmed the potential of UFPI-59 in promoting nodulation, N accumulation, plant growth and yield of lima bean in both locations.

**Key words:** *Phaseolus lunatus*; biological N fixation; *Rhizobium*; inoculation

### **1. Introduction**

Lima bean (*Phaseolus lunatus*) is an important legume crop cultivated in some countries of North, Central and South America (AMORIM et al., 2019), representing a substantial source of protein (ARAÚJO et al., 2015). In addition, lima bean presents high rusticity and capacity to withstand long dry periods similar those found in the Northeastern region of Brazil (SANTOS et al., 2011). Indeed, lima bean is cultivated by smallholder farms from the Northeastern region of Brazil, mainly the states of Piauí and Ceará, where the crop yield is estimated in 0.45 ton ha<sup>-1</sup> (IBGE., 2018). Despite of its importance, lima bean yet presents low production and one reason is the low N availability in soil.

However, lima bean is a N-fixing crop and this characteristic can increase its growth and yield (AMORIM et al., 2019). Thus, the biological N fixation (BNF) is an important process that can increase the lima bean yield (LOPES et al., 2015). Indeed, previous studies, under greenhouse conditions, have reported N-fixing

rhizobia contributing, through BNF, to the growth of lima bean (COSTA NETO et al., 2017; AMORIM et al., 2019).

The responses of plants to BNF varies according to the rhizobia (CARDOSO et al., 2017) and their growing region (LEGGETT et al., 2017). Thus, the evaluation of potential rhizobia should considerate their efficiency in different regions and soil conditions. So far, the studies evaluating potential N-fixing rhizobia are concentrated to soybean, common bean and cowpea (MERKEB et al., 2016; PINTO et al., 2007; BATISTA et al., 2017), while there are not studies with lima bean, mainly under field conditions in different regions. As consequence, lima bean does not have any recommended rhizobia for inoculation, being necessary to advance the studies for selecting rhizobia to this crop.

Therefore, it is necessary and important the searching of suitable agricultural practices to increase the lima bean yield. The optimization of BNF, by the selection of efficient N-fixing rhizobia, could contribute for increasing the lima bean yield. Thus, the aim of this field study was to evaluate the potential of rhizobia in increasing the lima bean yield in two regions from Piauí and Ceará states.

## 2. Material and methods

The experiments were simultaneously conducted at Piauí and Ceará states, Brazil, from May through September 2019. In Piauí state, the experiment was conducted in the Experimental Field from Universidade Federal do Piauí, Teresina (05°05'21"S; 42°48'07"W) under a mean of temperature of 28 °C and 70% of humidity. In Ceará, the experiment was conducted at Instituto Federal do Ceará, Tiangua (3°43'55"S; 41°0'45W) under a mean of temperature of 22 °C and 81% of humidity. The soils from Piauí and Ceará were classified as fluvic and Quartzarenic Neosols, respectively, and the chemical properties (0-20 cm) are shown in Table 1.

**Table 1.** Chemical properties of the soils used in this study

|       | pH<br>(H <sub>2</sub> O) | OM<br>(g kg <sup>-1</sup> ) | P<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) | K    | Ca<br>(cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> ) | Mg  |
|-------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------|---|-----|
| Ceará | 6.0                      | 17.0                        | 0.7                         | 19.5 | 1.2   | 0.5 |
| Piauí | 6.5                      | 8.3                         | 0.5                         | 15.6 | 1.3   | 0.7 |

OM – organic matter

Particularly, soil from Ceará presented low soil pH (5.0) and it was corrected by using 650 kg ha<sup>-1</sup> of dolomitic lime (17% CaO and 13% MgO) that was applied uniformly on the soil surface. The rate was calculated according to Bezerra et al. (2010).

Six treatments were compared under a randomized block design with four replicates. The treatments consisted of three rhizobia UFPI-32 (*Bradyrhizobium* sp.), UFPI-38 (*Rhizobium* sp.) and UFPI-59 (*Bradyrhizobium* sp.), isolated in soils from Piauí state (Antunes et al., 2011) and selected from previous studies under greenhouse conditions. These rhizobia one strain of reference to *Phaseolus vulgaris* (CIAT899; *Rhizobium tropici*) and two controls (PC – with N; NC – without N).

All strains were grown in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid culture broth (under orbital shaking at 200 rpm, 28 °C, 72 h). The bacterial growth was verified through a spectrophotometer (wavelength of 540 nm) considering a final concentration of 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Seeds of lima bean, genotype UFPI 480, were disinfested with alcohol (70%) for 30 seconds and sodium hypochlorite (2%) for 60 seconds, being washed five times with sterile distilled water. Afterwards, seeds were inoculated (in the inoculated treatments) and sowed, immediately, in plots with 30 m<sup>2</sup> each, with 20 m<sup>2</sup> of usable area for analysis, and rows are spaced 1.0 m apart. In each row, plants were spaced 1.0m between them which provides a total of 10000 plants per hectare. The positive control (+N) received 20 kg ha<sup>-1</sup> N (100 kg ha<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) at sowing. All plots received chemical fertilization with P (60 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) and K (30 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O). In both locations, lima bean was grown under rainfed conditions.

At 45 days after sowing (flowering stage), five plants from each plot were collected and excised at the cotyledonal node to separate shoots from roots. In the flowering stage, lima bean presents the highest number of active nodules (SANTOS et al., 2009). Nodules were separated from the roots and counted to determine nodule number (NN). Afterward, nodules, shoots and roots were dried (65°C; 72 h) and weighed to determine nodules (NDW), shoot (SDW) and roots (RDW) dry weight. Nodules size (NS) was estimated by using the ratio between NDW and NN, expressed as mg per nodule (ROCHA et al., 2019). Total N in plant was estimated by Kjeldahl method. At 70 days, lima bean yield was evaluated by sampling of five plants inside the plots and grains were dried for 13%.

The normality of data was analyzed by using the test of Shapiro-Wilk and treatments were assessed in two locations (Piauí and Ceará). Afterward, data were statistically analyzed by using ANOVA, and the means were compared using Scott-Knott test ( $p \leq 0.05\%$ ).

### 3. Results

Lima bean grown in Ceará showed the highest and lowest values of NN and NDW with CIAT 899 and NC, respectively (Table 2). However, the inoculation of UFPI-32 promoted similar value of NDW in lima bean as compared to CIAT 899. Although CIAT 899 has promoted higher NN and NDW in lima bean grown in Ceará, the value of NS was highest with UFPI-59. Regarding to lima bean growth, the values of SDW and RDW presented small variation between treatments (Table 2). Thus, PC presented the highest values of SDW, being similar to UFPI-32, UFPI-59 and CIAT 899, and higher than UFPI-38 and NC. In contrast, UFPI-32 promoted the highest RDW, being similar to UFPI-38, UFPI-59, CIAT 899 and PC, and different than NC. The inoculation of UFPI-59 and CIAT 899 promoted the highest accumulation of N in lima bean as compared to the other treatments (Table 2).

**Table 2.** Values of NN (nodule  $\text{pl}^{-1}$ ), NDW ( $\text{mg pl}^{-1}$ ), NS ( $\text{mg nodule}^{-1}$ ), SDW ( $\text{g pl}^{-1}$ ), RDW ( $\text{g pl}^{-1}$ ), and leaf N (%) in lima bean inoculated with rhizobia and grown in Ceará state. At 45 days of lima bean sowing.

|          | NN               | NDW               | NS               | SDW               | RDW               | Leaf N           |
|----------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| UFPI-32  | 150 <sup>b</sup> | 144 <sup>ab</sup> | 1.2 <sup>b</sup> | 2.2 <sup>ab</sup> | 2.3 <sup>a</sup>  | 1.3 <sup>b</sup> |
| UFPI-38  | 153 <sup>b</sup> | 109 <sup>c</sup>  | 0.9 <sup>b</sup> | 1.4 <sup>b</sup>  | 2.0 <sup>ab</sup> | 1.4 <sup>b</sup> |
| UFPI-59  | 148 <sup>b</sup> | 94 <sup>c</sup>   | 1.5 <sup>a</sup> | 1.8 <sup>ab</sup> | 1.9 <sup>ab</sup> | 1.8 <sup>a</sup> |
| CIAT 899 | 239 <sup>a</sup> | 157 <sup>a</sup>  | 0.7 <sup>b</sup> | 2.2 <sup>ab</sup> | 2.0 <sup>ab</sup> | 1.9 <sup>a</sup> |
| PC       | 147 <sup>b</sup> | 132 <sup>b</sup>  | 0.9 <sup>b</sup> | 2.4 <sup>a</sup>  | 1.8 <sup>ab</sup> | 1.2 <sup>b</sup> |
| NC       | 39 <sup>c</sup>  | 42 <sup>d</sup>   | 1.0 <sup>b</sup> | 1.4 <sup>b</sup>  | 0.8 <sup>c</sup>  | 1.4 <sup>b</sup> |

PC – positive control; NC- negative control

On the other hand, the values of NN did not vary between treatments in lima bean grown in Piauí, while that the inoculation of UFPI-59 and UFPI-32 promoted higher values of NDW (Table 3). Interestingly, the value of NS was found in lima bean inoculated with UFPI-59. Lima bean grown in Piauí presented the highest values of SDW with the inoculation of UFPI-38 and UFPI-59 (Table 3). However, the highest values of RDW were found in lima bean inoculated with UFPI-32 and UFPI-

59. Regarding to leaf N, the highest values were observed with the inoculation of UFPI-59 and CIAT 899.

**Table 3.** Values of NN (nodule  $\text{pl}^{-1}$ ), NDW (mg  $\text{pl}^{-1}$ ), NS (mg nodule $^{-1}$ ), SDW (g  $\text{pl}^{-1}$ ), RDW (g  $\text{pl}^{-1}$ ), and leaf N (%) in lima bean inoculated with rhizobia and grown in Piauí state. At 45 days of lima bean sowing.

|          | NN              | NDW             | NS               | SDW              | RDW              | Leaf N           |
|----------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| UFPI-32  | 17 <sup>a</sup> | 66 <sup>a</sup> | 3.5 <sup>b</sup> | 2.9 <sup>b</sup> | 4.3 <sup>a</sup> | 1.8 <sup>c</sup> |
| UFPI-38  | 10 <sup>a</sup> | 25 <sup>b</sup> | 2.3 <sup>c</sup> | 4.9 <sup>a</sup> | 2.1 <sup>b</sup> | 2.5 <sup>b</sup> |
| UFPI-59  | 18 <sup>a</sup> | 74 <sup>a</sup> | 4.6 <sup>a</sup> | 4.5 <sup>a</sup> | 3.5 <sup>a</sup> | 3.4 <sup>a</sup> |
| CIAT 899 | 13 <sup>a</sup> | 10 <sup>b</sup> | 0.7 <sup>d</sup> | 3.0 <sup>b</sup> | 2.1 <sup>b</sup> | 3.3 <sup>a</sup> |
| PC       | 15 <sup>a</sup> | 11 <sup>b</sup> | 0.6 <sup>d</sup> | 3.1 <sup>b</sup> | 2.2 <sup>b</sup> | 1.6 <sup>c</sup> |
| NC       | 9 <sup>a</sup>  | 25 <sup>b</sup> | 2.4 <sup>c</sup> | 2.8 <sup>b</sup> | 2.5 <sup>b</sup> | 1.9 <sup>c</sup> |

PC – positive control; NC- negative control

The highest values of grain yield were found in lima bean inoculated with UFPI-59 as compared to CIAT 899, PC and NC in both Ceará and Piauí state (Table 4). In addition, the inoculation of UFPI-38 also contributed to increase the grain yield as compared to PC and NC in both states.

**Table 4.** Values of yield (kg  $\text{ha}^{-1}$ ) of lima bean inoculated with rhizobia and grown in Piauí and Ceará states. At 70 days of lima bean sowing.

|          | Ceará             | Piauí             |
|----------|-------------------|-------------------|
| UFPI-32  | 437 <sup>c</sup>  | 816 <sup>b</sup>  |
| UFPI-38  | 801 <sup>ab</sup> | 998 <sup>ab</sup> |
| UFPI-59  | 1005 <sup>a</sup> | 1150 <sup>a</sup> |
| CIAT 899 | 410 <sup>c</sup>  | 758 <sup>b</sup>  |
| PC       | 650 <sup>b</sup>  | 350 <sup>c</sup>  |
| NC       | 400 <sup>c</sup>  | 175 <sup>c</sup>  |

PC – positive control; NC- negative control;

#### 4. Discussion

In this study, four potential rhizobia strains to lima bean inoculation were evaluated under field conditions in both Ceará and Piauí states. These strains were compared against a strain of reference to common bean (CIAT 899) and two controls (NC and PC). Although both states were not statistically compared, the

results showed higher nodulation in Ceará than Piauí, and it can be explained for the lowest soil temperature found in Ceará that contributed for a better environment to rhizobia.

Anyway, the results showed different responses to nodulation, i.e. nodule number and dry weight, in lima bean grown in Ceará and Piauí. In Ceará, CIAT 899 stimulated a greater number of nodule than other rhizobia, and it suggest that the rhizobia from Piauí (UFPI-32, UFPI-38, UFPI-59) do not present efficiency in stimulating nodulation in lima bean in Ceará. However, UFPI-32 promoted similar values of nodule biomass as compared to CIAT 899 in lima bean grown in Ceará. Since nodule biomass and size are the most important parameters to estimate the efficiency of BNF in comparison to nodule number (OGUTCU et al., 2010), these results suggest potential efficiency of UFPI-32 in nodulating lima bean in Ceará.

On the other hand, UFPI59 presented better performance in increasing the nodule size in lima bean in both states. The better performance of UFPI-59 in stimulating larger nodules could be important to increase the biological N fixation, since higher nodules contribute with more N fixed in the whole root system (TAJIMA et al., 2007). For instance, previous studies have reported that soybean presenting larger nodules exhibits high N fixation as compared to plants with smaller nodules (SATO et al., 2003; YASHIMA et al., 2003). Interestingly, UFPI-59 has been recognized as potential in previous studies with lima bean under laboratory and greenhouse conditions (ANTUNES et al., 2011; COSTA et al., 2020). In addition, this strain, classified as *Bradyrhizobium* sp., presents interesting biochemical features, i.e. it is positive for catalase, gelatinase and solubilization of P (CHIBEBA et al., 2020).

Indeed, UFPI59 contributed for increasing the N content in lima bean and it can be correlated to the higher nodule size found with this strain. There is a strong correlation between nodule size and N accumulation in plants (DELIC et al., 2010; VOISIN et al., 2015; HAMAWAKI and KANTARTZI, 2018) and it corroborates with the results observed in this study. It can indicate that UFPI-59 presents high effectiveness in contributing with N to lima bean. Previously, Antunes et al. (2011) also found UFPI-59 increasing N accumulation in lima bean under laboratory conditions.

Regarding to lima bean growth, the results showed variation between treatments and it can suggest that shoot and root biomass could not be suitable

parameters to evaluate rhizobia strain in lima bean. Anyway, UFPI-59 promoted high values of shoot and root dry weight in lima bean. In line with the results found on nodule size and N accumulation, the inoculation of UFPI-59 promoted the higher grain yield in lima bean. This grain yield is about twice as high as the average found in Ceará and Piauí states (IBGE, 2017). Thus, UFPI-59 seems to present potential to be recommended as inoculant to lima bean. The results also showed lower grain yield in soil without fertilization and even in fertilized plots, and these values are within the range found in previous studies with lima bean (SANTOS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011).

Finally, this study showed that, in general, nodules and plant parameters varied between Ceará and Piauí states. It means that there were differences in the responses of lima bean according to rhizobia and location. These differences between rhizobia on all evaluated parameters agree with some studies with cowpea (FARIAS et al., 2016), soybean (BARBOSA et al., 2017) and common bean (MERCANTE et al., 2017). Regarding to location, the results showed that lima bean presented better growth and yield in Piauí than Ceará, and it can be explained due to the genotype of lima bean used in this study is originated from Piauí, and it contributed for the better performance of this state crop. Anyway, the results have shown that UFPI-59 presents high potential to be recommended as inoculant to lima bean in Ceará and Piauí. However, further studies should be done to evaluate this strain under different N rates, lima bean genotypes, and at least for two years.

## 5. Conclusion

The strain UFPI-59, classified as *Bradyrhizobium* sp., promotes larger nodules, higher N accumulation and plant growth in lima bean. In addition, this strain increases the grain yield of lima bean in both Ceará and Piauí states which indicates this bacterium as a potential candidate to be recommended to inoculation in lima bean for the states of Piauí and Ceará. It is important to lima bean producers that can be benefited with higher grain yield through of a sustainable and biological technology.

## 6. References

AMORIM, M.R; ANTUNES, J.E.L; OLIVEIRA, L.M.S; ROCHA, S.M.B; AQUINO, J.P.A; FIGUEIREDO, M.V.B & ARAÚJO, A.S.F . Current knowledge and future prospects of lima bean (*Phaseolus lunatus*)-rhizobia symbiosis. **Revista de la Facultad de Ciências Agrárias**, 5:280-288, 2019.



ANTUNES, J.E.L; GOMES, R.L.F; LOPES, A.C.A; ARAÚJO, A.S.F; LYRA, M.C.C.P & FIGUEIREDO, M.V.B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 35:751-757, 2011.

ARAÚJO, A.S.F; LOPES, A.C.A; GOMES, R.L.F; BESERRA JUNIOR, J.E.A; ANTUNES, J.E.L & FIGUEIREDO, M.V.B. Diversity of native rhizobianodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume research**, 38:653– 657, 2015.

BARBOSA, L.P; COSTA, P.F; RIBEIRO, P.R.A; RUFINI, M; GUIMARÃES, A.A & MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency and genotypic characterization of variants of *Bradyrhizobium* spp. in commercial inoculants for soybeans. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 41:e0160572, 2017.

BATISTA, E.R; GUIMARÃES, S.L; BONFIM-SILVA, E.M & SOUZA, C.P.A . Combined inoculation of rhizobia on the cowpea development in the soil of Cerrado. **Revista Ciência Agrônômica**, 48:745-755, 2017.

BEZERRA, B.R; ARAÚJO, A.S.F; SANTOS, J.A & CARNEIRO, R.F.V .**Fertilidade do Solo e Adubação**. In: Angela Célis de Almeida Lopes; Regina Lúcia Ferreira Gomes; Ademir Sérgio Ferreira de Araújo (Ed.). A cultura do feijão-fava no meio norte do Brasil. Teresina, Edufpi. p. 129-138, 2010.

CARDOSO, A.A; ANDRAUS, M.P; BORBA, T.C.O; MARTIN-DIDONET, C.C.G & FERREIRA, E.P.B . Characterization of rhizobia isolates obtained from nodules of wild genotypes of common bean. **Brazilian Journal of Microbiology**, 48: 43-50, 2017.

CHIBEBA, A.M; PEREIRA, C.S; ANTUNES, J.E.L; RIBEIRO, R.A; LOPES, A.C.A; GOMES, R.L.F; HUNGRIA, M & ARAÚJO, A.S.F. Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. **Symbiosis**, 80:279-292, 2020.

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**, 73:117-124, 2017.

DELIĆ, D; STAJKOVIĆ, O; RASULIĆ, N; KUZMANOVIĆ, D; JOŠIĆ, D & MILIČIĆ, B. Nodulation and N<sub>2</sub> Fixation Effectiveness of *Bradyrhizobium* Strains in Symbiosis with Adzuki Bean, *Vigna angularis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53:293-299, 2010.

FARIAS, T.P; SOARES, B.L; ARAÚJO, A.R.A & MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency of rhizobia strains with cowpea in Southern Maranhão. **Revista Caatinga**, 29: 611 – 618, 2016.

HAMAWAKI , R.L & KANTARTZI, S.K. Di-nitrogen fixation at the early and late growth stages of soybean. **Acta Scientiarum Agronomy**, 40:e36372, 2018.

IBGE (2017). Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>. Acessado em:15 de Dezembro de 2019.

IBGE (2018). Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acessado em:10 de Fevereiro de 2020.

LEGGETT, M; DIAZ-ZORITA, M; KOIVUNEN, M; BOWMAN, R; PESEK, R; STEVENSON, C & LEISTER, T. Soybean response to inoculation with in the United States and Argentina. **Agronomy Jornal**,109: 1031-1038, 2017.

LOPES, Â.C.A; GOMES, R.L.F & ARAÚJO, A.S.F. **Phaseolus lunatus: diversity, growth and production**. New York, Nova Science Publishers. 177p, 2015.

MERCANTE, F.M; OTSUBO, A.A & BRITO, O.R. New Native Rhizobia Strains for Inoculation of Common Bean in the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 41: e0150120, 2017.

MERKEB, F; REDI, M & GEBREMEDHIN, W . Evaluation of Different Commercial Rhizobial Strains on Soybean (*Glycine max L.*) Yield at Pawe District, Northwestern Ethiopia. **World Scientific News**, 55:15-26, 2016.

OĞUTCU, H; KASIMOĞLU, C & ELKOCA, E. Effects of rhizobium strains isolated from wild chickpeas on the growth and symbiotic performance of chickpeas (*Cicer arietinum L.*) under salt stress Turkish. **Journal of Agriculture and Forestry**, 34: 361-371, 2010.

OLIVEIRA, F.N; TORRES, S.B & BENEDITO, C.P. Caracterização botânica e agrônômica de acessos de feijão fava, em Mossoró, RN. **Revista Caatinga**, 24:143-148, 2011.

PINTO, F.G.S; HUNGRIA, M & MERCANTE, F.M . Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). **Soil Biology & Biochemistry**, 39:1851–1864, 2007.

ROCHA, S.M.B; ANTUNES, J.E.L; SILVA, A.V.C.R; OLIVEIRA, L.M.S; AQUINO, J.P.A; MELO, W.J; FIGUEIREDO, M.V.B & ARAÚJO, A.S.F. Nodulation, nitrogen uptake and growth of lima bean in a composted tannery sludge-treated soil. **Ciência Rural**, 49:e20190301, 2019.

SANTOS, D; CORLETT, F.M.F; MENDES, J.E.M.F & WANDERLEY JÚNIOR, J.S.A .Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37:1407-1412, 2002.

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

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**, 61:437– 444, 2011.

SATO, T; KANETA, Y; FUKUTA, N; KOBAYASHI, H; SHINDO, H; OTA, T & SATO, A. Effect of soil physical properties on soybean nodulation and N<sub>2</sub> fixation at the early growth stage in heavy soil field in Hachirogata polder, Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, 49: 695-702, 2003.

Voisin AS, Prudent M, Duc G & Salon C (2015) Pea nodule gradients explain N nutrition and limited symbiotic fixation in hypernodulating mutants. **Agronomy for Sustainable Development**, 35:1529–1540.

Tajima R, New Lee NO, Abe J, Lux A & Morita S (2007) Nitrogen-Fixing Activity of Root Nodules in Relation to Their Size in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Production Science**, 10:423-429.

Yashima H, Fujikake H, Sato T, Ohtake N, Sueyoshi K & Ohyama T (2003) Systemic and local effects of long-term application of nitrate on nodule growth and N<sub>2</sub> fixation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Soil Science Plant Nutrition**, 49: 825-834.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tamanho das sementes e as condições edafoclimáticas são fatores importantes no processo de fixação biológica de nitrogênio interferindo nos fatores de nodulação, e crescimento das plantas. Para o feijão-fava, o isolado UFPI-59 proporcionou maior crescimento e rendimentos de grãos nos estados avaliados quando comparados aos demais isolados, podendo ser indicado como possível inoculante para esta cultura, porém existe a necessidade de maiores testes de campo por no mínimo dois anos para comprovação da sua eficiência.