

Diversidade e eficiência simbiótica de rizóbios de solos de clima semiárido tropical com diferentes fertilidades

Diversity and symbiotic efficiency of rhizobia from semiarid soils with different fertility

Thiago Pontes Lira¹, Cybelle Souza Oliveira¹, Jean Cheyson Barros Santos¹, Mario Andrade Lira Junior¹*

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife PE, Brasil

*autor correspondente
✉ mario.alirajr@ufrpe.br

Resumo: Explorar a diversidade da população nativa de rizóbios é uma forma de se obter estirpes eficientes e adaptadas a diferentes condições edafoclimáticas. Para este fim, o presente artigo avaliou a diversidade e eficiência simbiótica de isolados rizobianos provenientes de diferentes solos de uma região semiárida tropical do Brasil. Horizontes superficiais de solos com presença de leguminosas nativas foram coletados e caracterizados quanto aos seus atributos químicos e físicos e agrupados em alta e baixa fertilidade. Três experimentos foram conduzidos utilizando feijão-caupi. O primeiro para obtenção de nódulos, o segundo para avaliação da eficiência simbiótica em substrato estéril e o terceiro para avaliação da eficiência simbiótica em substrato não estéril. Os resultados demonstram uma ampla diversidade cultural rizobiana nos solos do semiárido, com diversidade influenciada pelos atributos do solo. Cinco isolados provenientes de solos de baixa fertilidade apresentaram potencial para exploração como inoculantes, com uma eficiência relativa de 38 a 60% em relação à fertilização nitrogenada. Estas maiores performances simbióticas provavelmente são decorrentes da pressão seletiva exercida pelas leguminosas nativas neste grupo de solos.

PALAVRAS-CHAVE: Feijão-caupi, FBN, inoculante.

Abstract: Exploiting native rhizobial population diversity is a way to obtain efficient strains adapted to different edaphoclimatic conditions. To this end, this study evaluates diversity and symbiotic efficiency of cowpea rhizobial strains from different soils of a tropical semiarid region in Brazil. Superficial horizons of soils with native legumes were collected and characterized for their chemical and physical attributes and grouped in high and low fertility. Three experiments were conducted using cowpea. The first to obtain nodules, the second to evaluate symbiotic efficiency on sterile substrate and third to evaluate symbiotic efficiency on non-sterile substrate. The results indicate large rhizobial cultural diversity in semiarid soils, affected by soil attributes. Five isolates from low soil fertility soils had potential for inoculant production, with a relative efficiency of 38 to 60% that of nitrogen fertilizers. These higher symbiotic performances likely result from selective pressure exerted by the native legumes on this soil group.

KEYWORDS: Cowpea, BNF, Inoculant.

Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma das principais fontes alimentares e de renda da região nordeste do Brasil eficiente na fixação biológica de nitrogênio em simbiose com bactérias diazotróficas, apresentando, também, importância em países africanos, como a África do Sul (SITHOLE et al., 2019). O feijão-caupi tem baixa especificidade simbiótica, o que aumenta a possibilidade de formar nódulos com bactérias nativas nos mais diferentes ambientes de cultivo, tanto eficientes quanto ineficientes (TAMPAKAKI et al., 2017), o que é útil para a seleção de isolados eficientes e adaptados às

condições edafoclimáticas locais (FERREIRA et al., 2019) em um processo multietapas, passando a obtenção de nódulos (no campo ou por uso de plantas isca), o isolamento de estirpes puras destes nódulos e a avaliação da eficiência destas em condições estéreis e não estéreis (CALHEIROS et al., 2015), normalmente incluindo a avaliação de sua diversidade.

Uma das ferramentas para isso é a caracterização fenotípica (CALAZANS et al., 2016) importante para o agrupamento de isolados fenotipicamente semelhantes e para a redução no número de indivíduos a serem estudados, diante do elevado número de isolados comumente obtidos na etapa de isolamento, particularmente em trabalhos avaliando múltiplos ambientes de origem para melhor avaliação do efeito de características edafoclimáticas sobre a diversidade e eficiência das populações rizobianas (SANTOS et al., 2017; BARROS et al., 2019).

Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram: a) avaliar a influência de fatores edafoclimáticos sobre a diversidade rizobiana; e b) verificar a eficiência simbiótica de isolados rizobianos de feijão-caupi provenientes de solos da região semiárida de Pernambuco, em substrato estéril e solo não estéril.

Material e Métodos

Amostragem do solo

Foram coletadas amostras de cada classe de solo de 11 municípios do semiárido pernambucano (Santa Cruz, Parnamirim, Serra Talhada, Sertânia, Petrolina, Floresta, Tupanatinga, Jataúba, Santa Cruz do Capibaribe, Bom Jardim e Caetés), com base no Zoneamento Agroecológico de Pernambuco (SILVA et al., 2001), avaliando a presença de espécies de leguminosas forrageiras dos gêneros *Desmanthus*, *Macroptilium* e *Stylosanthes* em 3 a 5 pontos por solo em cada município, na camada 0-10 cm, totalizando 1200 amostras em 300 pontos de coleta. Foram realizadas análises para caracterização química e física do solo de acordo com métodos padrões (EMBRAPA, 1999) e subamostras para obtenção de nódulos foram conservadas a 4 °C.

Com base nos atributos químicos e físicos, as amostras de solo foram agrupadas ao nível de 50% de similaridade, sendo obtidos oito grupos de solos. Destes, os dois mais diferentes entre si foram selecionados para obtenção de nódulos, sendo caracterizados como de alta (AF) e baixa fertilidade (BF) (Tabela 1).

Captura de isolados rizobianos dos solos do semiárido

Seis amostras de cada grupo de solos foram usadas para obtenção de nódulos utilizando o feijão-caupi variedade IPA 206 como planta-isca. As sementes foram desinfestadas superficialmente por 30s em álcool 70%, 3 min em hipoclorito de sódio 2,5-3% e 10 lavagens sucessivas com água destilada autoclavada. Foram colocadas para germinar quatro sementes por vaso com areia e vermiculita (2:1 v:v) autoclavada e inoculados dois gramas das amostras de solo por vaso. Após 7 dias de germinação realizou-se o desbaste, restando apenas duas plantas

por vaso. A colheita foi feita aos 45 dias e os nódulos foram acondicionados em tubos com sílica gel.

Foram selecionados de quatro a cinco nódulos por vaso e realizada a caracterização morfofisiológica (tempo de crescimento, diâmetro, cor, forma, borda, elevação, superfície e transparência da colônia, produção, consistência e elasticidade do muco e pH do meio de cultura) dos isolados obtidos (VINCENT, 1974) e, então, construída uma matriz binária com presença (1) e ausência (0) de cada característica separadamente para cada grupo de solos.

Um agrupamento com base no índice de Jaccard utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Analysis*), o índice de diversidade de Shannon-Weaver e a equitabilidade de Pielou foram calculados através do software PAST (HAMMER et al., 2001). Isolados representativos de cada grupo fenotípico foram selecionados para avaliação da eficiência simbiótica em substrato estéril.

Avaliação da eficiência simbiótica em substratos estéril e não estéril

A performance simbiótica dos isolados rizobianos foi avaliada em dois experimentos. O primeiro experimento (estéril) foi realizado em casa de vegetação como descrito na fase de captura dos isolados rizobianos, em vasos de 500 mL com mistura de areia e vermiculita (2:1 v:v) autoclavada e solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (HOAGLAND; ARNON, 1950). Sementes da mesma variedade de feijão-caupi foram desinfestadas superficialmente e realizada inoculação com 1,0 ml de caldo bacteriano em cada semente, adotando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 29 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram de 25 isolados, uma estirpe recomendada para feijão-caupi, o *Bradyrhizobium* sp. BR 3267=SEMIA 6462=GENBANK acesso AY649439 (BRASIL, 2011), e três controles sem inoculação: um sem N (0N) e dois nitrogenados correspondentes a uma adubação de 60 (60N) e 90 (90N) kg ha⁻¹ de N-ureia.

Tabela 1. Atributos químicos e físicos de solos usados para isolamento rizobiano.

	Alta Fertilidade	Baixa Fertilidade
pH (H ₂ O - 1:2,5)	7,7±0,2	5,04±0,6
K (cmol _c dm ⁻³)	0,3±0,2	0,15±0,12
Na (cmol _c dm ⁻³)	0,4±0,2	0,08±0,1
Ca (cmol _c dm ⁻³)	14,4±4,8	1,9±1,3
Mg (cmol _c dm ⁻³)	1,5±2,9	0,8±0,7
Ca+Mg (cmol _c dm ⁻³)	13,7±7,6	2,4±1,7
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	2,3±0,3	3,2±0,9
P (mg dm ⁻³)	33,3±41,3	7,6±5,3
CO (g kg ⁻¹)	7,21±3,26	4,77±2,27
Areia (g kg ⁻¹)	684,5±167,1	817,1±83,5
Silte (g kg ⁻¹)	206,0±69,4	103,0±52,4
Argila (g kg ⁻¹)	109,5±89,9	79,9±61,7
Classe textural	Franco arenoso	Areia franca

Média ± 95% intervalo de confiança; CO: carbono orgânico.

As plantas foram colhidas aos 45 dias após o plantio, sendo determinadas as massas secas da parte aérea (MSPA), do sistema radicular (MSSR) e dos nódulos (MSN), o número de nódulos (NN) e o N total pelo método de Kjeldahl. O acúmulo de N na parte aérea (ANPA) foi calculado multiplicando-se o teor de N total pela MSPA. Também foram calculadas as eficiências relativas de cada isolado em relação ao controle nitrogenado (ERN) e à estirpe recomendada (ERR), além da eficiência simbiótica (ES), pelas seguintes expressões:

$$ERN = \left(\frac{MSPA \text{ do tratamento}}{MSPA 90N} \right) \times 100$$

$$ERR = \left(\frac{MSPA \text{ do tratamento}}{MSPA \text{ da estirpe recomendada}} \right) \times 100$$

$$ES = \left[\frac{(Ntotal \text{ do tratamento} - Ntotal \text{ tratamento sem nitrogênio})}{(Ntotal \text{ do controle nitrogenado } 90N - Ntotal \text{ tratamento sem nitrogênio})} \right] \times 100$$

O segundo experimento (não estéril) foi conduzido em canteiros em campo aberto, contendo uma mistura de solo e esterco como substrato. As características químicas do substrato foram: pH (água) 6.4; Ca, Mg, K, Na e Al = 7.9, 2.6, 0.18, 0.18 e 0.15 cmol_c dm⁻³, respectivamente; H+Al = 5.06 cmol_c dm⁻³; P = 505 mg dm⁻³ e carbono orgânico 30.72 g kg⁻¹.

Sementes da mesma variedade de feijão-caupi foram desinfestadas e colocadas para germinar. Após 7 dias de germinação, as plântulas foram transplantadas para os canteiros e imediatamente realizada inoculação com 2,0 ml de caldo bacteriano em cada plântula, adotando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 16 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram dos 13 isolados mais eficientes em substrato estéril, uma estirpe recomendada para feijão-caupi, o *Bradyrhizobium* sp. BR 3267=SEMIA 6462, e dois controles sem inoculação: um sem adição de N (0N) e um nitrogenado correspondente a uma adubação de 60 (60N) kg ha⁻¹ de N-ureia.

A colheita e variáveis analisadas seguiram conforme descrito no ensaio em substrato estéril.

Análise de dados

Todos os dados foram submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

Resultados e discussão

Captura e caracterização morfofisiológica dos isolados rizobianos

A caracterização morfofisiológica dos isolados rizobianos foi analisada por agrupamento a 60% de similaridade. Foram obtidos 109 isolados rizobianos no experimento de captura rizobiana, dos quais 51 isolados foram provenientes do grupo de solos com alta fertilidade e 58 do grupo de baixa fertilidade, com dendrogramas resultando na separação de 20 e 22 grupos, respectivamente (Figuras 1 e 2).

Dentre as principais características em ambos solos, foram observados predomínio de isolados de crescimento rápido

(90 e 53%), produção de ácidos (73 e 41%) e produção de pouca a moderada de muco (88 e 72%), respectivamente em AF e BF. Os solos de alta fertilidade apresentaram apenas 10% dos isolados com crescimento lento, distribuídos nos grupos 9 e 10 do dendrograma, e 12% com escassa produção de muco distribuídos nos grupos 1, 4, 6 e 7. Contrariamente em relação a produção de muco, os 28% restantes dos isolados de baixa fertilidade exibiram abundante produção de muco e estão dispostos nos grupos 2, 7, 15, 17, 18, 19 e 20 do seu respectivo dendrograma.

O estabelecimento da simbiose com rizóbios de crescimento rápido e lento deve-se à baixa especificidade simbiótica do feijão-caupi. A nodulação do feijão-caupi é frequentemente estabelecida com isolados de crescimento lento em diversos ambientes (TAMPAKAKI et al., 2017; CHIDEBE et al., 2018; FERREIRA et al., 2019), porém a predominância de nodulação por rizóbios de crescimento rápido vem sendo cada vez mais observada (ONDIEKI et al., 2018; GIRIJA et al., 2018).

ONDIEKI et al. (2018) também observaram nodulação por rizóbios de ambos crescimentos, com predomínio de crescimento rápido em solos do Quênia, relacionando este resultado às estratégias de sobrevivência de isolados característicos de regiões áridas e semiáridas. Essas estratégias normalmente estão associadas à maior resistência à seca e rápida multiplicação dos rizóbios no curto período de chuva deste ambiente (SANTOS et al., 2007).

Além disto, a produção de muco dos isolados deste trabalho provavelmente funcionou como outra importante estratégia de adaptação e resistência ao clima hostil e a estresses ambientais, independentemente da quantidade de muco produzido (OLIVEIRA et al., 2014), sugerindo uma alta vantagem competitiva no estabelecimento da simbiose (ONDIEKI et al., 2018).

Com base nas características morfofisiológicas, o grupo de solos de alta fertilidade apresentou diversidade de Shannon de 3,87 e o de baixa fertilidade, de 3,72 (Tabela 2). Estes resultados demonstram que solos do semiárido têm uma ampla diversidade cultural rizobiana.

É provável que acidez ativa (pH 5.04) e potencial (H+Al 3.2 cmol_c dm⁻³) encontradas no grupo de solos BF tenham influenciado a diversidade, principalmente pelo alumínio ser mais tóxico e limitante ao crescimento rizobiano do que a acidez (CHAGAS JUNIOR et al., 2010) e ainda promover um efeito modulador sobre a comunidade microbiana na rizosfera de leguminosas do semiárido brasileiro (LANÇONI et al., 2013) através da supressão dos genes da nodulação (JAISWAL; NAAMALA; DAKORA, 2018).

Além da acidez do solo, a maior disponibilidade de nutrientes, matéria orgânica e teor de silte e argila de AF também podem ter favorecido o aumento na diversidade deste grupo de solos, pois além

Tabela 2. Índices de diversidade (Shannon-Weaver) e equitabilidade (Pielou) dos isolados de grupos de solos de alta e baixa fertilidade.

Grupos de solos	Shannon-Weaver	Pielou
Alta fertilidade	3,87	0,98
Baixa fertilidade	3,72	0,91

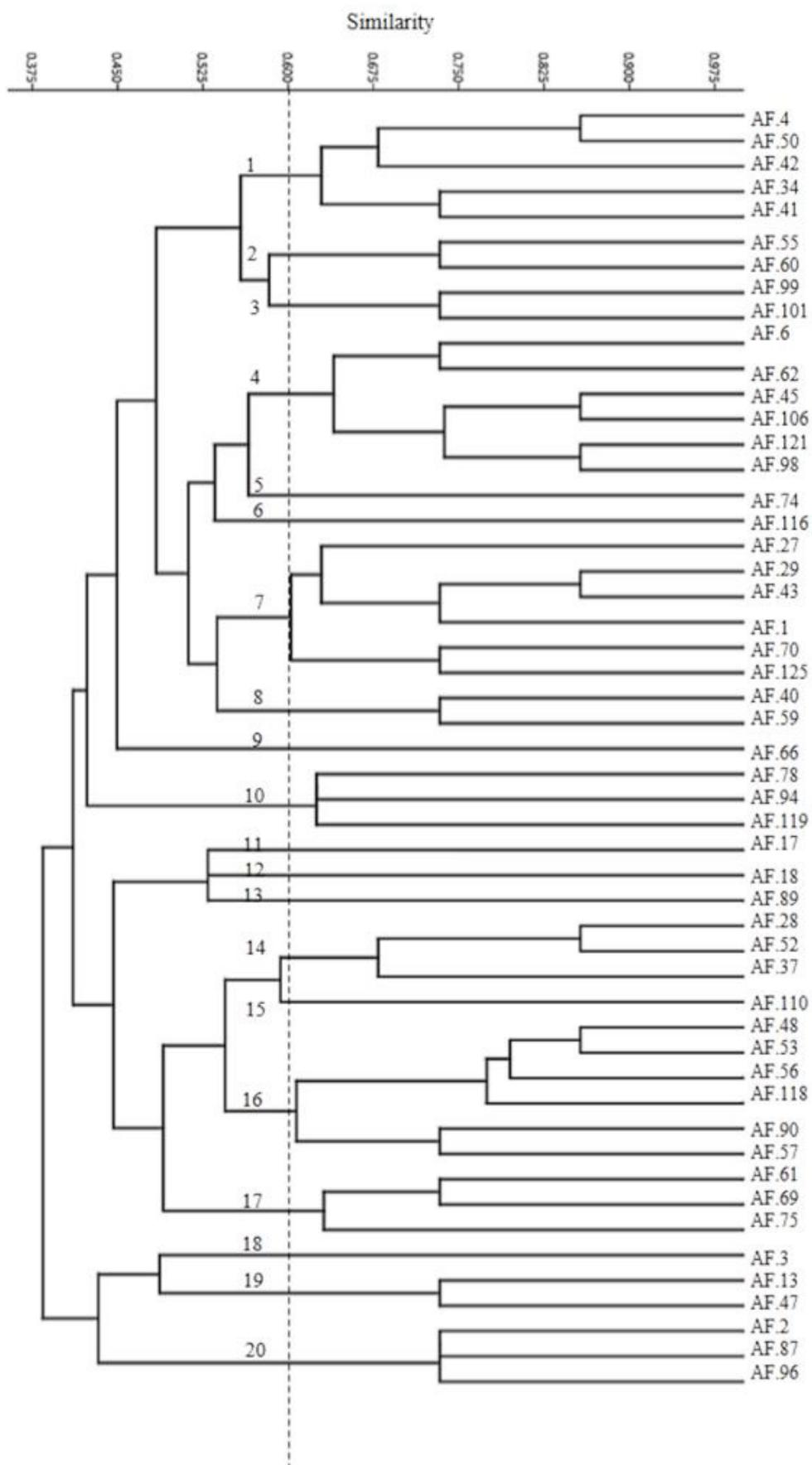


Figura 1. Dendrograma de similaridade dos isolados provenientes do grupo de solos com alta fertilidade, construídos a partir do agrupamento das características morfofisiológicas. Os grupos foram obtidos a 60% de similaridade.

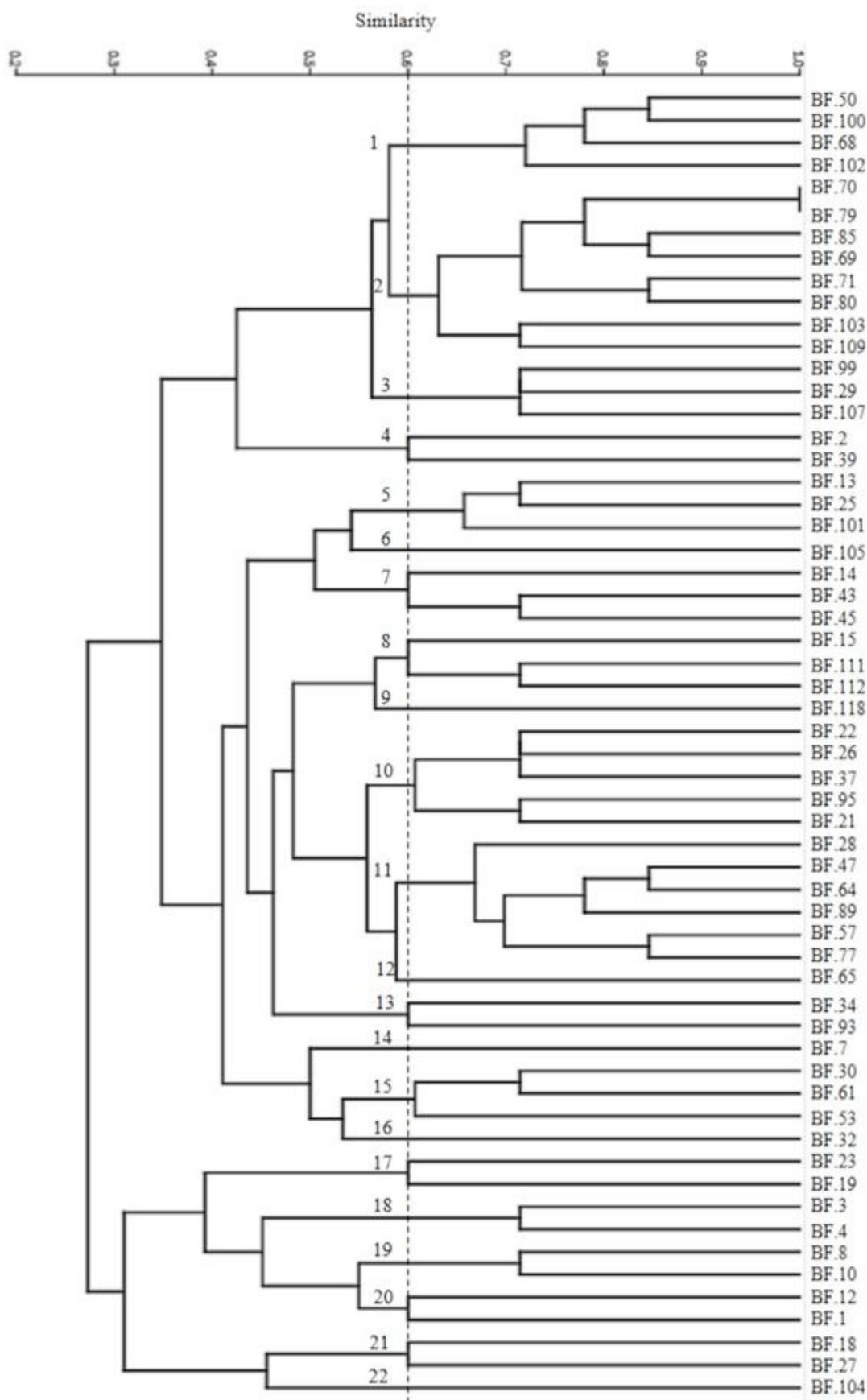


Figura 2. Dendrograma de similaridade dos isolados provenientes do grupo de solos com baixa fertilidade, construídos a partir do agrupamento das características morfofisiológicas. Os grupos foram obtidos a 60% de similaridade.

da maior demanda nutricional, o conteúdo de partículas finas do solo contribuiu com a manutenção da umidade e da matéria orgânica.

Autores relatam que a diversidade rizobiana é influenciada pelas características do solo, tais como textura (Wade et al., 2014), teor de carbono orgânico e disponibilidade de nutrientes (CHEMINING'WA et al., 2011). Zhang et al. (2007) relatam que o tamanho das partículas do solo muda a estrutura da comunidade microbiana e o aumento na diversidade bacteriana está atribuído ao maior teor de argila, carbono orgânico do solo e proteção física dentro dos microagregados. Guo et al. (2018) relataram que o aumento no teor de carbono orgânico em áreas de revegetação natural no semiárido aumentou a diversidade microbiana do solo. E Chemining'wa, Theuri e Muthomi (2011) observaram que a baixa disponibilidade de P reduziu a população rizobiana e nodulação do feijão-caupi.

Avaliação da eficiência simbiótica

Com base no agrupamento fenotípico dos 109 isolados, foram selecionados 25 isolados (4 do grupo AF e 21 do grupo BF) para teste de eficiência simbiótica em substrato estéril. Todos os isolados foram capazes de nodular a planta hospedeira e

não houve nodulação em nenhum dos tratamentos controles, confirmando ausência de contaminação e permitindo autenticar a simbiose e avaliar a eficiência simbiótica dos isolados.

A inoculação promoveu substancial incremento de nitrogênio em todas as plantas, exceto as estirpes BF.3 (0.44 mg planta⁻¹) e AF.99 (1.03 mg planta⁻¹) que não diferiram significativamente do controle não nitrogenado, enquanto 19 estirpes proporcionaram acúmulo de nitrogênio na parte aérea variando de 72.46 a 194.47 mg planta⁻¹, não diferindo estatisticamente do controle nitrogenado 90N nem da estirpe recomendada BR 3267. Destes, 16 isolados também obtiveram valores de ES superiores a estirpe recomendada (Tabela 3).

Estes resultados demonstram que a maioria dos isolados é eficiente em fixar N₂ permitindo maior produção de biomassa do que a fertilização nitrogenada com 60 kg ha⁻¹ de N-ureia, e até mesmo de 90 kg ha⁻¹ de N-ureia, como registrado por (RUFINI et al., 2014) em rizóbios nativos de solos de Minas Gerais capazes de fixar o equivalente à fertilização de 70 kg ha⁻¹ de N-ureia em feijão-caupi.

Tabela 3. Matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), número de nódulos (NN), eficiência relativa ao nitrogênio (ERN) e a recomendada (ERR) e eficiência simbiótica (ES) dos isolados de feijão-caupi obtidos de grupos de solos de municípios do semiárido pernambucano, em substrato estéril

Tratamentos	MSPA	MSSR	MSN	ANPA	NN	ERN	ERR	ES
		(g plant ⁻¹)		(mg plant ⁻¹)	(plant ⁻¹)		(%)	
BF.79	4.78 a	0.48 ab	0.42 a	157.64 a	189 abc	106.46 a	124.8 a	103.3 a
BF.25	4.78 a	0.44 ab	0.39 a	133.57 a	227 ab	106.46 a	124.8 a	116.2 a
BF.77	4.73 a	0.42 ab	0.38 a	191.15 a	225 ab	105.35 a	123.5 a	113.2 a
BF.85	4.31 a	0.48 ab	0.43 a	147.48 a	258 ab	95.99 a	112.5 a	92.3 a
BF.99	4.30 a	0.49 ab	0.35 a	130.04 a	280 a	95.77 a	112.3 a	91.3 a
BF.68	4.22 a	0.46 ab	0.30 ab	143.73 a	203 abc	93.99 a	110.9 a	97.0 a
BF.118	4.13 a	0.50 ab	0.31 ab	114.04 a	217 ab	91.98 a	107.8 a	89.6 a
BF.102	4.10 a	0.45 ab	0.46 a	124.58 a	242 ab	91.31 a	107.0 a	89.8 a
BF.12	4.17 a	0.48 ab	0.32 ab	194.47 a	187 abc	92.87 a	108.9 a	99.5 a
BF.7	4.09 ab	0.39 ab	0.25 ab	127.56 a	257 ab	91.09 ab	106.8 a	91.5 a
BF.32	3.98 ab	0.42 ab	0.36 a	111.87 a	169 abc	88.64 ab	103.9 a	93.1 a
BF.109	3.98 ab	0.37 ab	0.33 ab	124.62 a	158 abc	88.64 ab	103.9 a	78.7 a
BF.18	3.94 abc	0.41 ab	0.31 ab	129.67 a	199 abc	87.75 abc	102.9 a	100.5 a
BF.69	3.75 ab	0.41 ab	0.30 ab	90.00 a	210 abc	83.52 abc	97.9 a	81.6 a
AF.2	3.85 abc	0.43 ab	0.34 ab	72.46 a	237 ab	85.75 abc	100.5 a	79.2 a
BF.45	3.62 abc	0.40 ab	0.25 ab	95.49 a	211 ab	80.62 abc	94.5 a	85.7 a
BF.14	3.47 abc	0.30 ab	0.23 ab	86.12 a	163 abc	77.28 abc	90.6 ab	78.0 ab
BF.23	3.25 abc	0.31 ab	0.27 ab	85.96 a	204 abc	72.38 abc	84.9 abc	74.0 ab
BF.103	3.28 abc	0.37 ab	0.32 ab	87.49 a	200 abc	73.05 abc	85.6 abc	72.5 ab
BF.13	2.50 abc	0.34 ab	0.25 ab	55.25 ab	129 abc	55.68 abc	65.3 abc	56.2 b
BF.64	2.50 abc	0.29 ab	0.23 ab	58.54 ab	139 abc	55.68 ab	65.3 abc	50.3 b
AF.1	2.02 abc	0.35 ab	0.16 ab	69.73 ab	70 abc	44.99 abc	52.7 abc	40.8 b
AF.62	1.51 abc	0.27 b	0.21 ab	20.08 ab	64 abc	33.63 abc	39.4 bc	29.2 bc
BF.3	1.30 bc	0.27 b	0.13 bc	0.44 c	55 bc	28.95 bc	33.9 bc	20.7 c
AF.99	0.53 c	0.25 b	0.05 c	1.03 bc	9 c	11.80 c	13.8 c	1.2 d
BR3267	3.83 ab	0.43 ab	0.38 a	92.81 a	209 ab	85.30 ab	100.0 a	78.3 a
90N	4.49 a	0.61 a	-	183.20 a	-	100.00 a	117.2 a	100.0 a
60N	2.40 abc	0.52 ab	-	46.13 ab	-	53.45 abc	62.7 abc	44.3 b
0N	0.78 bc	0.24 b	-	0.65 c	-	17.37 bc	20.4 bc	-
CV (%)	22.33	15.77	19.79	22.98	23.70	13.09	22.33	22.43

Na coluna, média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente (P>0,05) pelo teste de Tukey. Dados de MSPA, MSSR, MSN e ERR transformados em raiz quadrada e NN, ANPA, ERN e ES transformados em Log10.

Tabela 4. Matéria seca da parte aérea (MSPA), do sistema radicular (MSSR) e dos nódulos (MSN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), número de nódulos (NN), eficiência relativa ao nitrogênio (ERN) e a recomendada (ERR) e eficiência simbiótica (ES) de feijão-caupi inoculado com isolados obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano, em solo não estéril.

Tratamentos	MSPA	MSSR	MSN	ANPA	NN	ERN	ERR	ES
		(g plant ⁻¹)		(mg plant ⁻¹)	(plant ⁻¹)		(%)	
BF.79	36.52 abc	3.03 a	1.27 a	858.21 abc	22 a	36.79 abc	104.0 abc	25.1 bc
BF.25	41.66 abc	2.12 a	0.19 a	856.16 abc	8 a	41.96 abc	118.6 abc	25.0 bc
BF.77	33.92 abc	2.15 a	0.59 a	441.83 abc	17 a	34.16 abc	96.6 abc	3.9 bc
BF.85	17.19 abc	1.76 a	0.46 a	246.78 abc	19 a	17.31 abc	48.9 abc	-5.9 bc
BF.99	43.09 abc	2.33 a	0.39 a	773.01 abc	26 a	43.40 abc	122.7 abc	20.8 bc
BF.118	59.55 ab	3.15 a	0.43 a	1256.16 ab	23 a	59.98 ab	169.6 ab	45.3 ab
BF.18	6.17 c	1.65 a	0.68 a	64.44 c	24 a	6.21 c	17.6 c	-15.2 c
BF.12	51.36 ab	2.89 a	0.11 a	876.16 ab	7 a	51.72 ab	146.2 ab	26.0 bc
BF.7	21.67 abc	2.49 a	0.80 a	461.69 bc	20 a	21.82 abc	61.7 abc	5.0 bc
BF.32	17.18 abc	1.99 a	0.65 a	304.43 abc	20 a	17.30 abc	48.9 abc	-3.0 bc
BF.45	13.55 bc	1.43 a	0.19 a	94.74 bc	22 a	13.64 bc	38.6 bc	-13.7 c
BF.23	20.15 bc	2.01 a	0.58 a	341.64 abc	17 a	20.29 bc	57.4 bc	-1.1 bc
BF.64	35.47 abc	2.39 a	0.43 a	621.42 abc	25 a	35.72 abc	101.0 abc	13.1 bc
BR 3267	35.12 abc	2.73 a	0.40 a	673.14 abc	28 a	35.37 abc	100.0 abc	15.7 bc
0N	24.27 abc	2.15 a	0.45 a	363.72 abc	18 a	24.44 abc	69.1 abc	0.0 bc
60N	99.29 a	4.51 a	0.36 a	2334.06 a	12 a	100.00 a	282.7 a	100.0 a
CV (%)	20.09	21.55	36.27	14.32	22.04	20.04	15.17	138.83

Na coluna, média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$) pelo teste de Tukey. Dados de MSPA, ANPA, NN, ERN e ERR transformados em Log10 e MSSR e MSN transformados em raiz quadrada.

Dos 25 isolados do teste em substrato estéril, 13 foram selecionados para o ensaio em canteiros com substrato não estéril. Destes, 5 isolados (BF.79, BF.25, BF.99, BF.118 e BF.12) tiveram MSPA, ANPA, ERN, ERR e ES notadamente maior que aquela do controle sem inoculação e sem adição de N mineral e fornecendo de 4 a 46% mais N às plantas do que a estirpe recomendada BR 3267 (Tabela 4), indicando grandes potenciais em fixar N₂ e exploração para uso como inoculante.

A simbiose com estes 5 isolados conseguiu fornecer de 38 a 60% do N equivalente na fertilização nitrogenada de 60 kg ha⁻¹ de N-ureia. Estudos indicam que o fornecimento de N₂ pela simbiose de rizóbios e feijão-caupi varia de 15 a 99% da necessidade da leguminosa (NCUBE et al., 2007; NAAB; CHIMPHANGO; DAKORA 2009). Esta variação deve-se à diversidade funcional do isolados (JAISWAL; DAKORA, 2019) e boa capacidade de competição dos isolados selecionados por sítios de infecção nodular (Oliveira et al., 2017; Ferreira et al., 2019).

Resultados semelhantes foram encontrados por Farias et al. (2016), ao identificarem isolados rizobianos de feijão-caupi mais eficientes em fixar N₂ do que as estirpes aprovadas como inoculantes, e por Kebede et al. (2020) ao relatarem a presença de isolados nativos de solos da Etiópia com alta eficiência agrônômica e potencial para uso como inoculantes. Isto se deve à adaptação dos isolados às características dos solos e condições edafoclimáticas locais, permitindo melhores resultados do que os inoculantes recomendados oriundos de ambientes adversos.

Apesar da diversidade levemente inferior no grupo BF, os isolados oriundos de tais solos demonstraram maior competitividade e eficiência na FBN em relação àqueles de solos AF, possivelmente por pressão seletiva por parte das leguminosas (HUNGRIA et al., 2000; LACERDA et al., 2004) bem como pela presença de leguminosas nativas.

Conclusões

A diversidade rizobiana é influenciada pelos atributos químicos e físicos de solos do semiárido.

Os rizóbios nativos de solos do semiárido têm alta diversidade simbiótica com feijão-caupi e a simbiose com isolados rizobianos de crescimento rápido e lento apoiam a promiscuidade da leguminosa.

Os isolados BF.79, BF.25, BF.99, BF.118 e BF.12 foram mais eficientes na produção de matéria seca e acúmulo de nitrogênio na parte aérea e apresentam potencial para produção de inoculante para feijão-caupi.

Agradecimentos

C. S. O. agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pela bolsa de doutorado e M. A. L. J. agradece à FACEPE pela bolsa de pesquisador visitante (BPV-0008-5.01/19). Todos os autores agradecem à CAPES (Finance Code 001), ao Conselho Nacional de Pesquisas e Desenvolvimento Científico (401896/2013-7 e 483287/2013-0) e à FACEPE (APQ-0453-5.01/15) pelo suporte financeiro.

Referências

- BARROS, V. D. C. et al. Diversidade rizobiana em função de solo e clima no semiárido pernambucano. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 24, n. 1, 2019. <http://dx.doi.org/10.12661/pap.2019.002>.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº13, de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 mar 2011. Seção 1, p. 3-7.
- CALAZANS, G. M. et al. Selection of efficient rhizobial symbionts for *Cratylia argentea* in the cerrado biome. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 9, p. 1594-1600, 2016.
- CALHEIROS, A. S. et al. Symbiotic effectiveness and competitiveness of Calopo Rhizobial isolates in an *Argissolo vermelho-amarelo* under three vegetation covers in the dry forest zone of Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, p. 367-376, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/01000683rbc20140393>.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 161-169, 2010.
- CHEMINING'WA, G. N.; THEURI, S. W. M.; MUTHOMI, J. W. Abundance of indigenous rhizobia nodulating cowpea and common bean in central Kenyan soils. **African Journal of Horticultural Science**, Nairobi v. 5, p. 92-97, 2011.
- CHIDEBE, I. N.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with Cowpea (*Vigna unguiculata*) nodulation in three agroecological regions of Mozambique. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 84, n. 2, p. e01712-e01717, 2018. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01712-17>.
- EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1999. 627 p.
- FARIAS, T. P. et al. Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão State. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 3, 2016.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FERREIRA, P. A. A. et al. New rhizobia strains isolated from the Amazon region fix atmospheric nitrogen in symbiosis with cowpea and increase its yield. **Bragantia**, Campinas, v. 78, p. 38-42, 2019.
- GIRIJA, D. et al. Isolation and characterization of native cowpea rhizobia from Wayanad India. **Legume Research**, India, v. 43, p. 126-133, 2018.
- GUO, Y. et al. Natural revegetation of a semiarid habitat alters taxonomic and functional diversity of soil microbial communities. **The Science of the Total Environment**, v. 635, p. 598-606, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.171>
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, United States, v. 4, p. 1-9, 2001.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. (Circular 347). Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950.
- HUNGRIA, M. et al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1515-1528, 2000.
- JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. Widespread Distribution of Highly Adapted Bradyrhizobium Species Nodulating Diverse Legumes in Africa. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 310, 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00310>.
- JAISWAL, S. K.; NAAMALA, J.; DAKORA, F. D. Nature and mechanisms of aluminium toxicity, tolerance and amelioration in symbiotic legumes and rhizobia. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, p. 309-318, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00374-018-1262-0>
- KEBEDE, E. ET AL. SYMBIOTIC EFFECTIVENESS OF COWPEA (*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.) NODULATING RHIZOBIA ISOLATED FROM SOILS OF MAJOR COWPEA PRODUCING AREAS IN ETHIOPIA. **COGENT FOOD & AGRICULTURE**, V. 6, N. 1, 2020. <HTTP://DX.DOI.ORG/10.1080/23311932.2020.1763648>.
- LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, p. 67-82, 2004.
- LANÇONI, M. D. et al. Microbial community biogeographic patterns in the rhizosphere of two brazilian semi-arid leguminous trees. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 29, p. 1233-1241, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-013-1286-4>.
- LEITE, J. et al. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 5, p. 1215-1226, 2009.
- MOHAMMED, M.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. DISTRIBUTION AND CORRELATION BETWEEN PHYLOGENY AND FUNCTIONAL TRAITS OF COWPEA (*VIGNA UNGUICULATA* L. WALP.)-NODULATING MICROSymbionts FROM GHANA AND SOUTH AFRICA. **SCIENTIFIC REPORTS**, V. 8, N. 18006, 2018. <HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41598-018-36324-0>.
- NAAB, J. B.; CHIMPHANGO, S. M.; DAKORA, F. D. N2 FIXATION IN COWPEA PLANTS GROWN IN FARMERS' FIELDS IN THE UPPER WEST REGION OF GHANA, MEASURED USING 15N NATURAL ABUNDANCE. **SYMBIOSIS**, V. 48, P. 37-46, 2009. <HTTP://DX.DOI.ORG/10.1007/BF03179983>.
- NCUBE, B. ET AL. PRODUCTIVITY AND RESIDUAL BENEFITS OF GRAIN LEGUMES TO SORGHUM UNDER SEMI-ARID CONDITIONS IN SOUTH WESTERN ZIMBABWE. **PLANT AND SOIL**, V. 299, P. 1-15, 2007.
- OLIVEIRA, C. S. et al. Expolysaccharides and abiotic stress tolerance in bacterial isolates from "Sábina" nodules. **Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 240-245, 2014.
- OLIVEIRA, D. D. P. et al. Acid tolerant *Rhizobium* strains contribute to increasing the yield and profitability of common bean in tropical soils. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 17, p. 922-933, 2017.
- ONDIEKI, D. K.; NYABOGA, E. N.; WAGACHA, J. M.; MWAURA, F. B. Morphological and Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from Agricultural Soils of Lower Eastern Kenya. **International Journal of Microbiology**, Amsterdam, v. 2018, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1155/2017/8684921>
- RUFINI, M. et al. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 1, p. 115-122, 2014.
- SANTOS, C. E. R. S. et al. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.
- SANTOS, Í. A. F. M. et al. New rhizobial strains for velvet bean (*Stizolobium aterrimum*) evaluated under greenhouse and field conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, p. 428-438, 2017.

- SILVA, F. B. R. et al. **Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco**. Recife: Embrapa Solos, Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento, Governo do Estado de Pernambuco, Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária, 2001.
- SITHOLE, N.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, M.; MAGADLELA, A. Nutritional status of soils from KwaZulu-Natal modulate symbiotic interactions and plant performance in *Vigna unguiculata* L. (Walp). **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v. 142, p. 1-7, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.05.009>.
- TAMPAKAKI, A. P. et al. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. **Systematic and Applied Microbiology**, Germany, v. 40, n. 3, p. 179-189, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.01.001>
- VINCENT, J. M. Root-nodule symbioses with Rhizobium. In: Quispel, A. (Ed.). **The biology of nitrogen fixation**. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1974. p. 265-341.
- WADE, T. K. et al. Eco-geographical diversity of cowpea bradyrhizobia in Senegal is marked by dominance of two genetic types. **Systematic and Applied Microbiology**, Germany, v. 37, n. 1, p. 129-139, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.10.002>.
- ZHANG, P. et al. Changes in microbial community structure and function within particle size fractions of a paddy soil under different long-term fertilization treatments from the Tai Lake region, China. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 58, n. 2, p. 264-270, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.03.018>.

Recebido: 16 abr. 2020
Aceito: 25 jun. 2020