



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA**



**INOCULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULO DE CULTIVARES DE
FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

ANTONIA JERLENE MARTINS DE LIMA

RIO BRANCO, AC
ABRIL / 2024

ANTONIA JERLENE MARTINS DE LIMA

**INOCULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULO DE CULTIVARES DE
FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: PROF. DR. JOSIMAR BATISTA FERREIRA

Coorientadora: PROF. DR. ELIANE DE OLIVEIRA

RIO BRANCO, AC
ABRIL / 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

INOCULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULO DE CULTIVARES
DE FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

ANTONIA JERLENE MARTINS DE LIMA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 2 de Abril de 2024

DR. JOSIMAR BATISTA FERREIRA
UFAC

DR^a. LEILA PRISCILA PETERS
UFAC

DR. THIAGO ALVES SANTOS DE OLIVEIRA
UFAC

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

L732i Lima, Antonia Jerlene Martins de, 1993-
Inclusão e caracterização fenotípica de bactérias isoladas de cultivares de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) / Antonia Jerlene Martins de Lima; orientador: Prof. Dr. Josimar Batista Ferreira, coorientadora: Profa. Dra. Eliane de Oliveira. – 2024.
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Inovação Tecnológica para a Amazônia (CITA). Rio Branco, 2024.
Inclui referências bibliográficas.

1. Nitrogênio - Fixação. 2. Feijão caupi. 3. Microbiologia agrícola.
I. Ferreira, Josimar Batista (orientador). II. Oliveira, Eliana (coorientadora). III. Título.

CDD: 509

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo – CRB 11º/1003.

Dedico a todas as pessoas que de uma forma ou outra me ajudaram ou me incentivaram para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço aos meus orientadores Professor Josimar e professora Eliane pela oportunidade, recepção, confiança e paciência.

Aos meus amigos Paula, Táciia, Tatiana, Juliane, Sheila e João Batista, pelo apoio e incentivo nessa jornada e por estarem me suportando nesse período difícil. A todos os meus colegas de turma e amigos, em especial Laryssa, Renan, Gleicyane e Rosália, por toda a ajuda e suporte emocional.

Agradeço a CAPES pelo financiamento.

Agradeço principalmente a minha família, aos meus irmãos Helisson e Aliton que me incentivaram a escolher o caminho acadêmico, a minha sobrinha Bruna pela ajuda no laboratório e finalmente a minha mãe Marlene Martins de Lima e ao meu pai Leoncio Correa Lima que suportou dias difíceis na minha ausência e me apoiou todo tempo nessa pesquisa.

“Education is our passport to the future, for tomorrow belongs to the people who prepare for it today.”

MALCOLM X

RESUMO

O processo de fixação biológica de N pode ser uma alternativa para a substituição, parcial ou total, dos adubos nitrogenados, além de diminuir os custos de produção e economizar combustíveis fósseis utilizados para a fabricação de fertilizantes nitrogenados. A fixação biológica do nitrogênio é de fundamental importância na sustentabilidade agrícola. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) é uma espécie leguminosa que se beneficia consideravelmente da inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium*. O feijão-Caupi é comumente utilizado como planta isca para a captura de bactérias do solo e a caracterização fenotípica das bactérias existentes nos nódulos contribui para o conhecimento da sua diversidade em coleções e para a utilização posterior em sistemas agrícolas. O objetivo desse estudo é isolar e caracterizar fenotipicamente estirpes de nódulos de feijão caupí e verificar a eficiência da nodulação em relação à fixação biológica de nitrogênio. Para isso, foi realizada a caracterização morfológica de 36 isolados de bactérias, obtidos de nódulos de feijão-caupi. As características avaliadas foram: alteração de pH, tempo de crescimento, produção de muco e características morfológicas das colônias. Posteriormente foi realizado o ensaio em casa de vegetação. A análise das características das cepas bacterianas revelou traços típicos de *Bradyrhizobium*, com crescimento médio a lento e pH neutro predominante. No experimento em casa de vegetação, as cepas inoculadas, especialmente a ISO04, demonstraram uma notável fixação de nitrogênio, apesar da ausência de diferenças significativas na massa seca da parte aérea. Esses resultados destacam o potencial das cepas isoladas para melhorar a eficiência da simbiose com as plantas de feijão-caupi em comparação com as cepas comerciais.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio; bactérias fixadoras; inoculação de sementes, *Bradyrhizobium*, sistema produtivo de praia, solos Amazônicos.

ABSTRACT

The process of biological nitrogen fixation can serve as an alternative to partially or completely replacing nitrogen fertilizers, thereby reducing production costs, and saving fossil fuels used in the manufacturing of nitrogenous fertilizers. Biological nitrogen fixation plays a fundamental role in agricultural sustainability. Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) is a leguminous species that significantly benefits from inoculation with nitrogen-fixing bacteria of the genus *Bradyrhizobium*. Cowpea is commonly used as a bait plant to capture soil bacteria, and phenotypic characterization of bacteria existing in the nodules contributes to understanding their diversity in collections and their subsequent use in agricultural systems. The objective of this study is to isolate and phenotypically characterize cowpea nodule strains and assess nodulation efficiency in relation to biological nitrogen fixation. Morphological characterization of 36 bacterial isolates obtained from cowpea nodules was conducted, evaluating pH alteration, growth time, mucilage production, and colony morphological characteristics. Subsequently, a greenhouse assay was performed. The analysis of bacterial strain characteristics revealed typical traits of *Bradyrhizobium*, with medium to slow growth and a predominant neutral pH. In the greenhouse experiment, inoculated strains, particularly ISO04, exhibited notable nitrogen fixation despite the absence of significant differences in aerial dry mass. These results underscore the potential of isolated strains to enhance symbiosis efficiency with cowpea plants compared to commercial strains.

Keywords: biological nitrogen fixation; fixing bacteria; seed inoculation, *Bradyrhizobium*, beach production system, Amazonian soils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Local da coleta. A- Localização geográfica do município de cruzeiro do Sul/AC. B- Pontos de coleta. cal da coleta.....	26
Figura 2. Coleta dos nódulos.....	26
Figura 3. A. Representação esquemática da riscagem em placas com meio de cultura. Técnica de esgotamento, recomendada para a obtenção de colônias isoladas. B. Colonias isoladas pela técnica de esgotamento em placas.....	28
Figura 4. Características morfológicas das colônias de rizóbios em relação a sua forma (A), elevação(B), borda (C), aspectos da superfície (D) e produção de muco (E).....	E
rror! Bookmark not defined.	9
Figura 5. Preparo dos vasos para a inoculação das bactérias em meio líquido.....	30
Figura 6. Preparo do experimento em casa de vegetação. A. Sementes pré germinadas em placas; B. Semente posicionada na abertura da garrafa; C. Recipientes prontos para receber o agente biológico; D. plantas separadas por bloco; E. experimento instalado em casa de vegetação.....	31
Figura 7. Características morfofisiológicas das culturas de bactérias isoladas dos nódulos feijão de praia coletados as margens do Rio Juruá, Cruzeiro do Sul-Acre. pH; TC (tempo de crescimento); FC (forma da colônia); EC (elevação da colônia); BC (borda da colônia); AS (aspecto da superfície); PM (produção de muco); CC (coloração da colônia); EM (elasticidade do muco)	33
Figura 8. Alteração do pH. (A- alcalina; B- neutro; C- Acido)	34
Figura 9. Eficiências relativa das cepas das cepas com melhor desempenho.	39

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Composição do meio de cultura.....	27
Tabela 2. Composição da solução nutritiva de Hoogland.....	Error! Bookmark not defined. 9
Tabela 1 Crescimento, diâmetro e alteração do pH das colônias isoladas dos nódulos de plantas de feijão-caupi coletadas em cultivo de praia.....	34
Tabela 1 Análise de variância	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido
AL	Alcalina
AM	Aspecto do Coloco
AS	Aspecto da Superfície
ATL	Altura do Ramo Principal
BC	Borda da Colônia
CI	Crescimento Intermediário
CC	Coloração da Colônia
CL	Crescimento Lento
CM	Consistência do Muco
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CR	Crescimento Rápido
EC	Elevação da Colônia
EM	Elasticidade do Muco
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
FC	Forma da Colônia
N ₂	Nitrogênio
NH ₃	Amônia
NT	Neutra
PM	Produção de Muco
CLO	Teor de Clorofila
TC	Tempo de Crescimento
YMA	Yeats Mannitol Agar
MSFA	Massa Fresca Da Parte Aérea
MSPA	Massa Seca Da Parte Aérea
NN	Número De Nódulos
MSN	Massa Seca Dos Nódulos
MSR	Massa Seca Da Raiz
EFR	Eficiência Relativa
TRAT	Tratamento

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	FEIJÃO-CAUPI (<i>VIGNA UNGUICULATA</i> (L.) WALP.)	17
2.2	FEIJÃO CAUPI NO BRASIL E NO MUNDO.....	18
2.3	A IMPORTÂNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	20
2.4	CAUPI E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	21
2.5	NODULAÇÃO E SIMBIOSE	22
2.7	ESTIRPES NATIVAS.....	23
3.	OBJETIVOS	25
3.1	GERAL.....	25
3.2	ESPECÍFICOS	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ISOLAMENTO DAS ESTIRPES DE MICRORGANISMOS DOS NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI ²⁶	
4.1.1	<i>LOCAL DA COLETA DOS NÓDULOS</i>	26
4.1.2	<i>DESINFECÇÃO DOS NÓDULOS E RISCAGEM EM PLACAS DE PETRI.</i>	27
4.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES ISOLADAS.....	28
4.3	TESTAR A EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	29
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.	31
5.	RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES	33
5.2	EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO	35
6.	CONCLUSÃO.....	40
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial, vem também a necessidade de avanços na tecnologia de produção para suprir as demandas por alimentos (CRUZ et al., 2019). O Agronegócio emergiu como um pilar fundamental que impulsiona e dinamiza a economia brasileira e mundial e, devido a sua importância, a agricultura tem intensificado a demanda por insumos químicos/sintéticos, cuja fabricação resulta em significativos impactos ambientais (BARROS, 2022) e utilização de recursos não renováveis.

Os principais impactos negativos observados foram a degradação da saúde físico-química e biológica do solo, a perda de biodiversidade e a erosão genética, o desequilíbrio ecológico, o ressurgimento de pragas e doenças, o esgotamento/degradação de recursos, incluindo terra, água e combustíveis fósseis, a redução da tolerância ao stress nas culturas, estagnação do rendimento e, em última análise, ameaça à sustentabilidade (JOHN e BABU, 2021).

Com isso, o uso de insumos agrícolas biológicos é uma alternativa mais sustentável, porque utiliza menor quantidade de energia para sua produção causando menos impacto ao meio ambiente, tornando o seu uso indispensável para a produção em grande escala (LOPES, 2018). O uso de inoculantes pode diminuir os custos de produção e suprir as necessidades de nitrogênio para a produção, através da fixação biológica de nitrogênio (VIEIRA NETO et al., 2008). O inoculante é um produto com um alto número de bactérias diazotróficas simbióticas mutualistas com as raízes das *Fabaceae* (JENSEN, 1987). Essas bactérias através de um diálogo químico entre planta e microrganismos infectam as raízes e formam os nódulos onde se alojam e iniciam o processo de fixação do nitrogênio atmosférico que é transformado em nutrientes assimiláveis para as plantas que em troca fornecem carboidratos para as bactérias (GOYAL; SCHMIDT; HYNES, 2021).

Segundo a AGEITEC (Agência Embrapa de Informação Tecnológica) alguns inoculantes já comercializados são capazes de elevar a produção. O Ministério da Agricultura possui cadastrado mais de 90 tipos de inoculantes para uso agrícola (EMBRAPA, 2019).

Os microrganismos são usados na agricultura para promover o crescimento de muitas culturas, porém as plantas da família *Fabaceae* são uma fonte de nitrogênio para as plantas, promovendo o seu crescimento. O nitrogênio para a produção agrícola pode ser obtido totalmente pela fixação biológica, o que pode dispensar o uso de fertilizantes nitrogenado. O

nitrogênio fixado da atmosfera pelas bactérias é alterado através de reações bioquímicas na planta e posteriormente transformado em aminoácidos, proteínas e outros compostos (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Uma das grandes vantagens da fixação biológica de nitrogênio é a redução do uso de adubos nitrogenados e, conseqüentemente a produção destes adubos e a poluição de recursos hídricos. Além disso, a fabricação de fertilizantes nitrogenados industriais depende da queima de combustíveis fósseis, e para ser obtido são necessários níveis elevados de pressão e temperatura (ALVES et al., 2006).

A fixação biológica é resultante da interação rizóbio/planta, que ocorre da seguinte maneira: o rizóbio invade o tecido vegetal por meio de mecanismos de infecção, que resultam em nódulos. Os nódulos permitem que o rizóbio sobreviva dentro do hospedeiro sob a forma de bacteroides, onde fixam nitrogênio gasoso sob a forma de amônia para fornecer à planta hospedeira. Por sua vez, a planta hospedeira fornece aminoácidos e carbono à bactéria (HEATH; TIFFIN, 2009a). Plantas da família *Fabaceae* são capazes de ser noduladas facilmente com um grupo de rizóbio presente no solo, designado como grupo miscelânea rizóbio tropical, característica encontrada também em várias espécies dessa família de ocorrência nos trópicos (RUMJANEK et al., 2006).

O feijão Caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) da família *Fabaceae*, também conhecido como feijão de corda ou em algumas regiões conhecido como feijão de praia, é uma cultura extremamente rustica, que pode se adaptar a áreas já exploradas e obter um desempenho satisfatório, podendo tolerar altas temperaturas (FREIRE FILHO, 2011). O feijão caupí é uma das culturas de maior importância econômica para as regiões norte e nordeste. Na região norte geralmente cultivado as margens dos rios onde a fertilidade natural do solo pode promover uma boa produção para a cultura, pois parte da sua produção são de ribeirinhos e da agricultura familiar, no estado do Acre (OLIVEIRA et al., 2015)

No Brasil, o melhor exemplo de utilização econômica da FBN e da inoculação é encontrado com a cultura da soja. O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo (AMAZONAS, 2018). Boa parte da produção dessa cultura se deve ao processo de fixação biológica de nitrogênio, através da simbiose com bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium* e contribui para o balanço positivo das exportações brasileiras (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007)

Um dos sistemas de cultivo bem difundido na região são os feijões plantados nas praias dos rios de águas brancas (JESUS et al., 2016). Por exemplo, A produtividade do feijão caupí pode aumentar com o uso de inoculantes de rizóbios eficientes e assim suprir as necessidades de nitrogênio da planta e reduzir o uso de adubação nitrogenada (ZILLI et al., 2009) , para tanto é necessário o isolamento e o teste de estirpes nodulíferas quanto a sua eficiência.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Feijão-Caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

O feijão é considerado um dos mais antigos alimentos utilizados pelo homem, tornando-se parte fundamental da dieta de várias civilizações (BASSAN et al., 2001). O feijão caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) nativo da África, foi introduzido em meados do século XVII no Brasil, pelos portugueses no Estado da Bahia, a partir dessa época o feijão-caupí foi se espalhando de forma gradativa em todo país. (FREIRE FILHO, 2011).

O caupí é conhecido em todo Brasil. A cultura possui um nome popular em cada região. Na região Nordeste feijão-de-corda; na região Norte, feijão-de-praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada; na região Sul, feijão-miúdo. Na região Norte e nordeste, existe um tipo de feijão-caupí muito importante para a culinária local (FREIRE FILHO, 2011). Esse caupí possui grãos de cor creme, muito pequenos é conhecido no Acre como manteiguinha (SIVIERO et al., 2016).

De acordo com Freire Filho (2011) no Brasil são cultivadas várias espécies de feijão; porém, somente o *Phaseolus vulgaris* (L.) feijão comum e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e feijão-caupí, são considerados como feijão pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A produção de feijão-caupí concentra-se em sua maioria nas regiões Nordeste e Norte. A produção do caupí nas duas regiões é feita por empresários e agricultura familiar que ainda utilizam práticas tradicionais (FREIRE FILHO, 2011).

O plantio do caupí na região norte é feito em praias onde o solo é renovado após cada cheia do rio, denominados de solos de várzea. São variedades crioulas armazenadas ano após ano pelos próprios agricultores que, ao praticarem essas atividades, selecionam as sementes com maior vigor e resistência a doenças para o plantio (SIVIERO et al., 2016).

O feijão-caupí pode ser encontrado em três segmentos no mercado: grãos secos, feijão-verde (vagem verde ou grão verde debulhado) e sementes para o plantio. Essa cultura vem passando por grandes mudanças tanto no setor produtivo, com a expansão do plantio para outras regiões, quanto no setor comercial, com uma melhor padronização do produto com o início do processamento industrial e com a entrada do produto em novos mercados do país e do exterior (FREIRE FILHO, 2011).

No Acre o feijão caupí e o feijão comum têm grande importância socioeconômica em especial para o Vale do Juruá não só como alimento, mas também como gerador de emprego e renda para pequenos produtores da região (OLIVEIRA et al., 2016). A diversidade agrícola dos plantios conta com nove variedades crioulas plantadas e descritas apenas para o estado do Acre (OLIVEIRA et al., 2015). É um alimento rico em proteína, minerais e fibras que constitui um componente alimentar básico das populações rurais e urbanas das regiões (SIVIERO et al., 2016).

Essa leguminosa possui hábito de crescimento determinado e indeterminado. O determinado caracteriza-se por ter o caule e os ramos laterais terminados em inflorescência (inflorescência terminal) e por possuir um número limitado de nós; a floração inicia-se do ápice para a base da planta. O crescimento indeterminado é constituído de uma haste principal da qual saem ramos laterais, possuem um número ilimitado de nós, os ramos primários se originam diretamente da haste principal e os secundários se originam dos primários e assim por diante. As gemas apicais não se diferenciam em inflorescência e a planta continua produzindo flores e folhas por um período longo, sendo que as flores partem das axilas da planta (MATTAR et al., 2016).

A planta pode possuir porte ereto, prostrado, semiereto e semiprostrado. A planta com porte ereto facilita a colheita, como as plantas ficam retas a produção fica concentrada e a colheita pode ser feita em uma única vez, o que facilita a colheita mecanizada. As plantas prostradas apresentam vantagens caso o produtor opte pela venda de feijão verde devido ao amadurecimento dos grãos em épocas diferentes e ao aumento do tempo de colheita do feijão (FILHO et al., 2008).

O cultivo Caupí ocorre em duas temporadas por ano. A primeira é plantada no início da estação chuvosa (novembro a março) e representa cerca de 71% da produção média nacional. A segunda safra ocorre no final da estação chuvosa (abril a agosto) e corresponde por 29% da produção média anual. Os principais sistemas de produção são: pertencentes a culturas úmidas e consorciadas (incluindo milho e/ou mandioca) e culturas perenes (monocultura de primeira safra, monocultura de segunda cultura e rotação de arroz de terra firme (CONAB & DERAL/SEAB; 2021). No Acre são encontrados os sistemas de produção de praia (JESUS et al., 2016).

Apesar de ser uma planta que se adapta bem a solos pobres em nutrientes, ainda possui um baixo rendimento de produtividade (OLIVEIRA et al., 2016). Esse baixo rendimento está relacionado aos problemas edáficos, à irregularidade de chuva ou ao fornecimento inadequado no cultivo irrigado, aos fatores fitossanitários, e a falta de tecnologia que melhore as condições de cultivo e produtividade. A média de produtividade nacional é muito baixa, aproximadamente 500 kg/ha^{-1} , se comparada a média de produtividade de feijão comum, cerca $1,5 \text{ t/ha}^{-1}$ (CONAB, 2022).

Na hora do produtor escolher qual variedade usar, tem algumas características que deve levar em consideração. Os tipos de grão e vagem devem atender as exigências dos comerciantes e produtores. É importante saber se a cultivar tem ciclo precoce ou tardio, se a planta é ereta ou prostrada, se é resistente a pragas e doenças e se o grão é próprio para consumo seco ou na forma de feijão-verde (MATTAR et al., 2016).

2.2 Feijão caupí no brasil e no mundo

De acordo com Censo Agropecuário 2017, o Brasil produziu 458.069 t de feijão-caupi em todo país, em um total de 932.947 estabelecimentos empresariais e familiares. Os três estados que mais produziram feijão-caupi, respectivamente, são: Mato Grosso (165.277 t), Ceará (69.347 t), Bahia (61.504 t). A maior parte dos estabelecimentos produtores está concentrado no Nordeste (93,2%), porém se tratando de região com maior produtividade, o Centro-Oeste fica na frente, a produção do Mato Grosso sozinho corresponde a 36% da produção nacional (IBGE, 2019).

O feijão-caupi tem uma grande importância socioeconômica no país, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde é considerada uma cultura de subsistência em pequenas propriedades. Constitui-se como gerador de emprego e renda na agricultura familiar, é ainda um alimento básico principalmente para as populações de baixa renda dessas regiões. Os grãos secos são considerados uma excelente fonte de proteínas (23 a 25% em média), contém todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62% em média), vitaminas, minerais, fibras, baixa quantidade de gordura e não possui colesterol, apresentando maior valor nutricional do que o feijão comum. Por isso torna-se extremamente relevante uma maior divulgação de sua importância alimentar e para os agricultores familiares dessas regiões e para a população em geral, bem como, mais estudos nesse tema (FILGUEIRAS, 2009).

De acordo com a CONAB, na safra 2021/2022 a área colhida de feijão-caupi no Brasil foi de 1,2 milhões de hectares, corresponde a 42% da produção total de feijão, e sua produção correspondeu 21% da produção de feijão (feijão comum e feijão-caupi), produzindo 637 t (CONAB, 2022), 39% a mais que a produção em 2017, que é um número bem expressivo, mostra que tem crescido bastante a sua produção.

Nas regiões que tradicionalmente produzem o feijão-caupi, as cultivares utilizadas são pouco produtivas porque o plantio é feito com baixo nível de tecnologia. A produtividade varia conforme a safra e o tipo de sistema de produção (consorciado ou solteiro). O conjunto desses fatores somados a irregularidades das chuvas, a suscetibilidade a pragas e doenças e o baixo potencial de rendimento de grãos justifica a baixa produtividade encontrada na maior parte das lavouras de feijão-caupi (LEITE et al., 2009). No Acre, alguns dessas limitações são superadas no sistema produtivo de praia, pois os solos são férteis e praticamente não é observado estresse hídrico, devido ao elevado nível do lençol freático (JESUS et al., 2016).

Por fim, o feijão-caupi tem se tornado uma cultura de importância socioeconômica para o país, apresentando muitas potencialidades a serem exploradas tanto no âmbito da produção, do consumo, como do mercado nacional e internacional. Por isso, é necessário pensar em tecnologias mais coerentes com os sistemas de produções e na organização da sua cadeia produtiva que beneficie os seus diferentes segmentos, principalmente a agricultura familiar (OLIVEIRA et al., 2016).

Conforme dados da FAO (2020) a produção mundial de feijão-caupi em 2014 foi de aproximadamente 5,6 milhões de toneladas produzidas em 12,5 milhões de hectares, no entanto esse número pode ser considerado ainda maior, pois muitos países como o Brasil e a Índia que possuem uma produção expressiva não fornecem dados estatísticos separados da produção de feijão comum.

2.3 A importância da fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) acontece quando microrganismos conhecidos como bactérias diazotróficas promovem a quebra da ligação de N_2 (nitrogênio atmosférico) e transforma para uma forma inorgânica NH_3 (amônia) e o deixa disponível para a planta e outros organismos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Os microrganismos dependem desse nutriente presente na atmosfera que não é assimilável para células eucariontes como, por exemplo, as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Para Zilli (et al., 2006) o N é o nutriente que mais limita a produção agrícola em regiões tropicais e a fixação biológica se tornou muito importante para a produção vegetal. Dentre os nutrientes minerais essenciais às plantas, o nitrogênio (N) é o mais caro o que consome mais energia para sua produção industrial e potencialmente, o mais poluente, sendo geralmente o mais limitante à produção vegetal. E a fixação biológica de nitrogênio vem mostrando-se indispensável para a sustentabilidade da agricultura brasileira (MELO; ZILLI, 2009).

O nitrogênio constitui 78% da atmosfera na forma gasosa (N_2), além de ter o papel estrutural na composição de aminoácidos, ácidos nucleicos, polissacarídeos entre outros. Apesar dessa abundância, as células vegetais não conseguem assimilar esse elemento na forma em que ele está disponível na atmosfera. Isso ocorre porque o N_2 é uma molécula com uma ligação tripla covalente, que lhe confere grande estabilidade, tornando-o pouco reativo em condições normais. Para que ele seja assimilável é necessário quebrar essas ligações e transformá-lo na forma amoniacal (HUNGRIA et al., 1998).

O nitrogênio é essencial à vida, e em regiões tropicais, é fator limitante da produção agrícola. A deficiência desse elemento em formas assimiláveis pelas plantas é compensada com o uso de fertilizantes nitrogenados. No entanto, o uso do fertilizante químico nitrogenado eleva muito o custo da produção, além de acarretar sérios problemas ambientais (LIBA et al., 2006; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Já a transformação biológica utiliza apenas a energia solar, caracterizando um processo totalmente sustentável e de baixo custo.

A fixação biológica de nitrogênio se constitui então a principal via de incorporação do nitrogênio à biosfera. É considerado um dos processos biológicos mais importantes do planeta, sendo possível com a ajuda de alguns microrganismos conhecidos como rizóbios que possuem um complexo enzimático, a nitrogenase, capaz de transformar o N_2 em amônio. O exemplo mais conhecido é a simbiose de bactérias

conhecidas como “rizóbio” com plantas da família Fabaceae, que compreendem, por exemplo, a soja e o feijão (SNYDER; BRUULSEMA; JENSEN, 2008). A interação entre leguminosas e rizóbio é um exemplo de interação biológica bastante estudada, no qual possibilita a substituição em parte ou totalmente do adubo nitrogenado (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

Esse processo de transformação catalisado pelo complexo enzimático nitrogenase acontece dentro de uma estrutura chamada nódulo. A formação do nódulo é um processo complexo de comunicação química que envolve N_2 , mudanças na planta hospedeira e na célula bacteriana, onde a bactéria visa ao recebimento de fontes de carbono como energia e potencial redutor para a transformação do nitrogênio, e a planta hospedeira, ao recebimento da amônia produzido pelas bactérias (HUNGRIA et al., 1998)

O nitrogênio além de ser o nutriente exigido em maior quantidade, é o que representa o maior custo na produção e, como muitos agricultores familiares não possuem recursos para aquisição desse nutriente, observa-se uma série de deficiências ao longo do plantio, acarretando baixa produtividade e por isso se faz necessário aprofundar os estudos relacionados a alternativas sustentáveis e acessíveis a esses produtores (SNYDER; BRUULSEMA; JENSEN, 2008). Como por exemplo estudar as estirpes dos nódulos ou dos solos, que apresentam nodulação espontânea com os diferentes tipos de leguminosas.

A Fixação Biológica de Nitrogênio desponta como uma real solução ecológica e sustentável reconhecidamente eficiente em feijão-caupi que, quando bem nodulado, pode atingir altos níveis de produtividade (SANTOS et al., 2005). O feijão-caupi é capaz de realizar simbiose com diversas espécies de bactérias do grupo “rizóbio”, sendo considerado um hospedeiro promíscuo. Nos sistemas agrícolas, a FBN tem se constituído como uma fonte sustentável de nitrogênio em contraponto à grande quantidade de energia não renovável utilizada na produção de fertilizantes sintéticos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

2.4 Caupí e fixação biológica de nitrogênio

O feijão caupí é muito cultivado nas regiões tropicais dos continentes africano, asiático e americano, e constitui a principal fonte de proteína, principalmente para populações de baixa renda (OLIVEIRA et al., 2016). A cultura é uma excelente fonte de proteínas (23-25%) e de carboidratos (62%), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura, com teor de óleo de 2% (AURAS; AMÂNCIO, 2015).

Essa leguminosa é capaz de ser nodulada facilmente com um grupo de rizóbio presente no solo, designado como grupo miscelânea feijão-caupí ou rizóbio tropical, característica encontrada também em várias outras leguminosas de ocorrência nos trópicos. (RUMJANEK et al., 2006).

A influência mútua do caupí com bactérias fixadoras de N₂ atmosférico, comumente designadas rizóbios, utilizando inoculantes, permite a ampliação do rendimento produtivo da cultura. Prática que pode substituir parcialmente ou totalmente o uso de adubos nitrogenados, o que pode diminuir os custos de produção (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

Para o caupí não há uma estimativa, em termos econômicos, da contribuição da FBN. No entanto, sabe-se que é importante para manter a produtividade das lavouras de subsistência, em que a adubação nitrogenada mineral não ocorre (MARTINS et al., 2003).

Em experimentos conduzidos em condições de campo, mostraram-se aumentos nos rendimentos de grãos em tratamentos inoculados com estirpes de rizóbio selecionados (ZILLI et al., 2006). Portanto, é imprescindível a difusão desta biotecnologia, de baixíssimo custo, para a cultura do feijão caupí, considerando que a fixação biológica do nitrogênio é um processo ecológico e economicamente vantajoso que pode substituir os fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

2.5 Nodulação e simbiose

A nodulação espontânea é um processo pelo qual as leguminosas formam nódulos radiculares de forma natural nas condições específicas de solo. Os nódulos radiculares são estruturas especiais que abrigam bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas como rizóbios (SILVEIRA; FREITAS, 2007). As leguminosas têm a capacidade de estabelecer essa relação simbiótica com os rizóbios. Essa relação mutualística beneficia tanto as plantas quanto as bactérias envolvidas (GIARDINI; et al., 1979).

A fixação biológica de nitrogênio pelas leguminosas reduz a necessidade de fertilizantes nitrogenados, economizando custos de produção e minimizando o impacto ambiental associado ao uso de fertilizantes sintéticos. Além disso, o nitrogênio fixado pelas leguminosas pode estar disponível para outras culturas subsequentes, melhorando a produtividade do sistema agrícola, através da ciclagem de matéria orgânica (FAGAN et al., 2007).

A FBN é resultado da interação rizóbios e Fabaceae, que ocorre quando a bactéria invade o tecido da raiz da planta causando a formação de um nódulo, de forma totalmente controlada pela planta. Esses nódulos permitem a sobrevivência dos rizóbios dentro do hospedeiro, e a fixação biológica do nitrogênio gasoso que é transformado em amônia que é fornecida para a planta hospedeira. E a planta disponibiliza carboidratos à bactéria (HEATH; TIFFIN, 2009b).

Podemos dizer que a soja é uma cultura rentável no Brasil graças à administração deste fenômeno, permitindo a fixação de grandes quantidades de nitrogênio, resultando em elevadas produtividades sem a adição de nitrogênio químico. (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

No entanto, é importante ressaltar que nem todas as leguminosas têm a mesma capacidade de nodulação espontânea. A presença e eficiência dos rizóbios apresenta especificidade para cada espécie de leguminosa existe uma espécie ou estirpe de rizóbio mais eficiente do que outra, influenciado também pelas condições ambientais e a disponibilidade de outros nutrientes no solo (JESUS et al., 2016). Portanto, a seleção adequada das leguminosas e dos rizóbios simbióticos é fundamental para maximizar os benefícios da nodulação espontânea em solos de várzea (HARA et al., 2022).

2.7 Estirpes nativas

Dentre as espécies de leguminosas que podem estabelecer simbiose com bactérias do solo, o feijão-caupi é considerada a mais promíscuas, podendo inclusive ser utilizada como planta isca para o isolamento de rizóbios que nodulam outras espécies como o feijão comum ou a soja (MELLONI et al., 2020).

O feijão-caupi tem a capacidade de estabelecer associações simbióticas com algumas espécies bacterianas englobadas no grupo “rizóbio”, compreendendo os gêneros *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, entre outros. Nesse contexto, existe a possibilidade de ganhos de produtividade através da FBN ao adquirir esses insumos biológicos em empresas especializadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006)

O inoculante comercial é um produto vivo, à base de bactérias capazes de absorver o nitrogênio do ar e transferi-lo para as raízes da planta, reduzindo a dependência de fertilizantes químicos nitrogenados. O processo de inoculação já é muito utilizado em leguminosas no Brasil, (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). É uma tecnologia de baixo custo e não oferece risco de poluição ambiental, além de ser uma prática sustentável ao substituir os insumos sintéticos por biológicos. No entanto, por ser um produto vivo, o tempo de prateleira costuma ser baixo (no máximo seis meses) exigindo condições específicas de armazenamento e transporte.

De acordo com dados da ANPII (Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculante) a produção e comercialização de inoculante para feijão-caupi no país começou em 2012, em 2018 ainda não chegou perto de 1% do total de doses comercializadas no Brasil (entre gramíneas e leguminosas), onde a venda de inoculantes para soja representam 87% do total da cadeia (ANPII, 2020). Esses dados refletem os desafios da agropecuária quando falamos de tecnologias para a diversidade que o país produz.

De acordo com o diário oficial da união, diversas cepas de *Bradyrhizobium sp.* foram identificadas em associação com a espécie de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Entre elas, destacam-se a cepa UFLA 3-84 (número de acesso 6461), proveniente da Universidade Federal de Lavras (UFLA), a cepa BR3267 (número de acesso 6462), originária da Embrapa Agrobiologia, a cepa INPA3-11B

(número de acesso 6463), também da UFLA, e a cepa BR 3262 (número de acesso 6464), associada à Embrapa Roraima. Cada uma dessas cepas é identificada por uma sequência específica de acesso, sendo EF158574 para UFLA 3-84, AY649439 para BR3267, EF158575 para INPA3-11B e AY649430 para BR 3262. Essas informações fornecem uma visão abrangente das diferentes cepas de *Bradyrhizobium sp.* associadas ao feijão-caupi e suas respectivas origens.

Atualmente, quatro estirpes são autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a inoculação do feijão-caupi, são elas: UFLA 3-84, BR 3267, INPA 3-11B e BR 3262 (tabela 1), (MAPA, 2011).

Pensando em alternativas para a inoculação comercial, e que seja viável para a agricultura familiar, utilizando recursos locais, existem alguns estudos relacionados isolamento de estirpes nodulíferas de nódulos, que é acessível e pode representar uma alternativa sustentável para aumentar a atividade de fixação biológica de nitrogênio nos nódulos de feijão-caupi e a sua produtividade em pequenas unidades familiares de produção agropecuária.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Isolar e caracterizar fenotipicamente bactérias fixadoras de N₂ e avaliar a eficiência dessas bactérias no crescimento de plantas de feijão caupi.

3.2 Específicos

- Isolar estirpes de nódulos espontâneos de feijão-caupi plantado no sistema de praia;
- Caracterizar fenotipicamente as estirpes isoladas;
- Testar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio das estirpes isoladas em condições controladas.

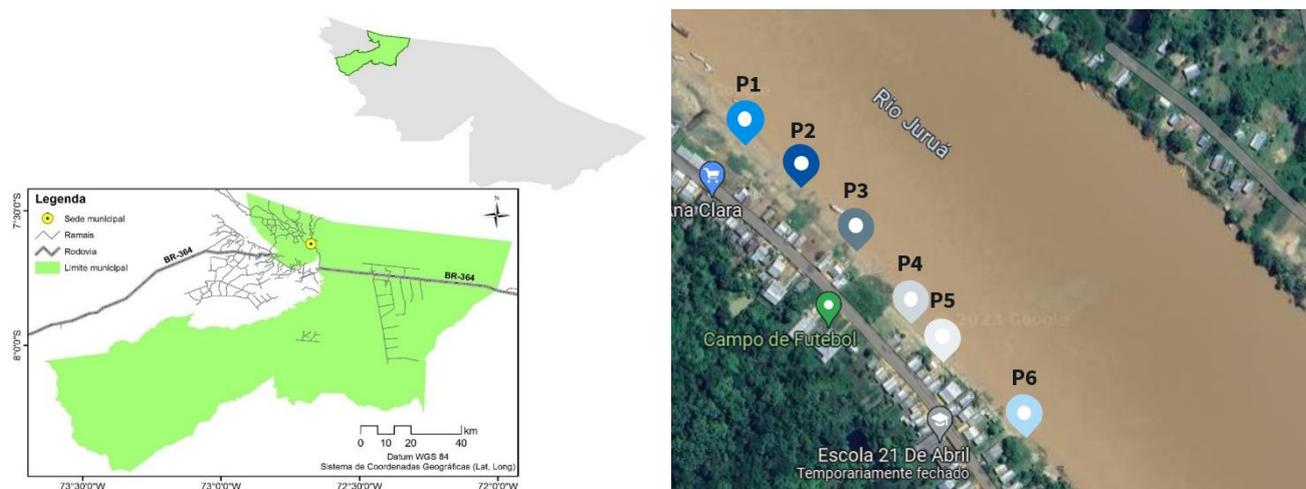
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento das estirpes de microrganismos dos nódulos de feijão-caupi

4.1.1 Local da coleta dos nódulos

A região de estudo está localizada no município de Cruzeiro do Sul, no estado do Acre, extremo oeste da Amazônia brasileira, no vale do Alto Juruá (figura 1-A). O clima da região é caracterizado como tropical quente e úmido, com temperatura média anual de 24,5° C, com uma precipitação pluviométrica média de aproximadamente 2000 mm anual, sendo o período de junho a setembro considerado o mais seco do ano (SILVA et al., 2021).

Figura 1. Local da coleta. **A-** Localização geográfica do município de Cruzeiro do Sul/AC. **B-** Pontos de coleta.



Fonte: **A-** SILVA, S. S. (2017). **B-** Google Earth

A coleta dos nódulos foi feita no mês de agosto do ano de 2022, em plantios de agricultores familiares realizado nas praias que se formam no período da vazante, no curso do rio Juruá, em seis pontos nos solos considerados jovens (figura 1-B). Foram coletadas três plantas de cada ponto. As plantas se encontravam no estágio R1 pré-floração (Figura 2); e, os nódulos foram separados das raízes, lavados com água destilada autoclavada e armazenados em frascos com algodão e sílica gel para mantê-los secos durante o período de armazenamento a 10° C.

Figura 2. Coleta dos nódulos.



4.1.2 Desinfecção dos nódulos e riscagem em placas de petri.

Para o isolamento dos microrganismos, os nódulos coletados foram imersos, durante duas horas em água destilada e esterilizada, para reidratação. A desinfecção dos nódulos foi feita de acordo com o método adaptado descrito por HUNGRIA; ARAUJO, 1994, que consistiu na imersão em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 4 minutos e em álcool 96% por 5 a 10 segundos; em seguida, foi feita lavagem, por meio de transferências sucessivas em cinco placas de *Petri*, com água destilada autoclavada. A seguir os nódulos foram esmagados e feita a riscagem em placa de *petri*, contendo meio de cultura YMA adicionado Azul de bromotimol (indicador de pH), (tabela 1). As colônias foram repicadas sucessivamente até a obtenção de culturas puras HUNGRIA; ARAUJO, 1994.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura.

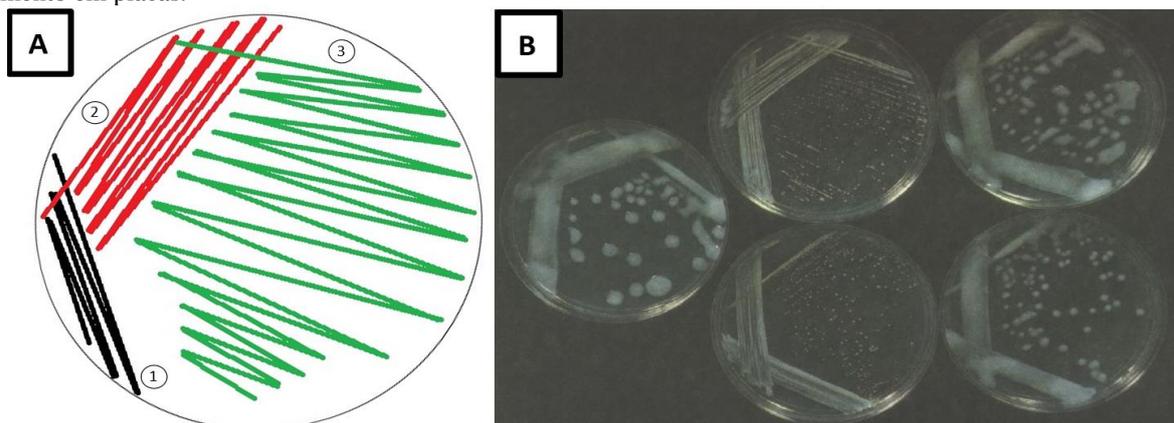
Meio de cultura (YMA)	
Reagente	Quantidade
Manitol	10 g/l
K ₂ HPO ₄	1ml/l
KH ₂ PO ₄	4ml/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	2ml/l
Na Cl	1ml/l
Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N de KOH)	5ml/l
Complexo B	0,4 ml/l
Extrato de Levedura	0,4 g/l de
Agar	16 g/l meio solido 1,75 semissólido

pH 6,8 – 7

Fonte: (HUNGRIA; ARAUJO, 1994).

Para isolamento das colônias, foi utilizado a técnica de esgotamento, em três campos da placa (figura 2 -A). Foram selecionadas as colônias isoladas no terceiro campo e repicadas para um novo meio de cultura e feita um novo isolamento para obtenção de colônias puras. As placas foram incubadas em condições ambiente (com temperatura média de 25°C) para o desenvolvimento das colônias por um período de 5 a 10 dias. Posteriormente as estirpes isoladas foram caracterizadas avaliando-se taxa de crescimento, alterações no pH do meio, produção de muco, coloração das colônias, e as características morfológicas citadas por COSTA JÚNIOR (et al., 2009), como resultado será possível ser feita identificação presumida do gênero.

Figura 3. Técnica adotada para isolamento as bactérias A. Representação esquemática da riscagem em placas com meio de cultura. Técnica de esgotamento, recomendada para a obtenção de colônias isoladas. B. Colônias isoladas pela técnica de esgotamento em placas.

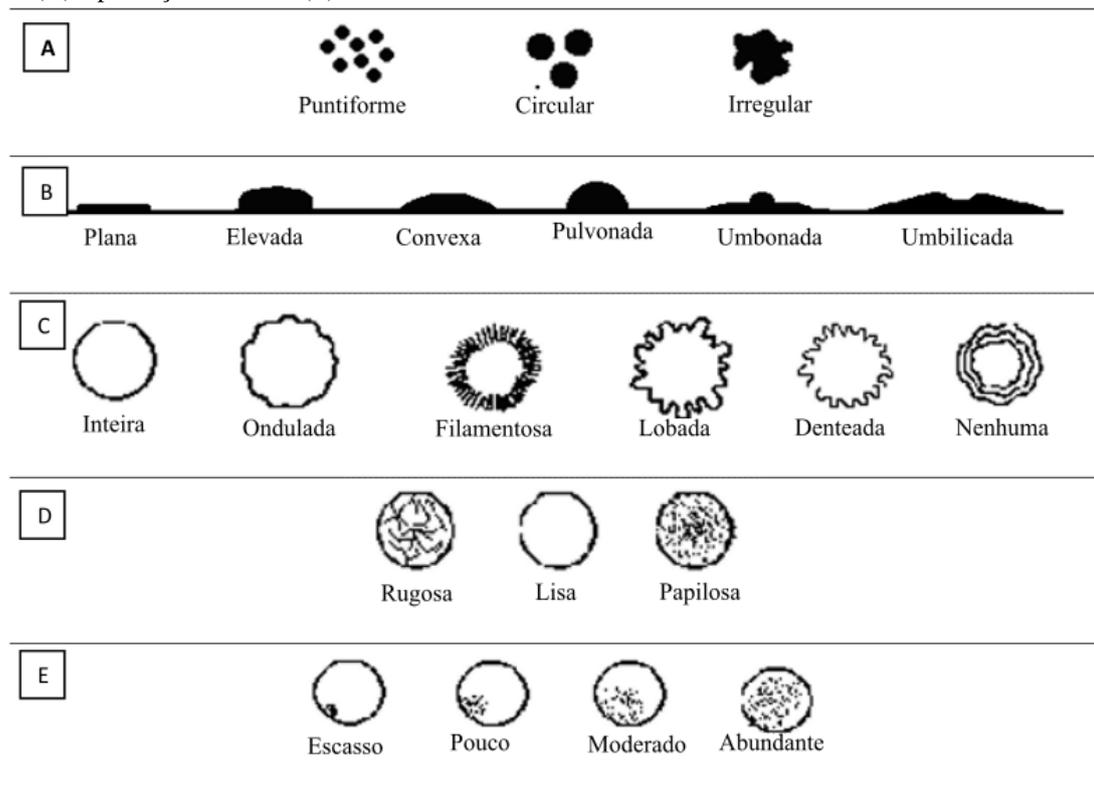


Fonte: A. esquema feito pelo autor; B. (HUNGRIA; ARAUJO, 1994).

4.2 Caracterização Fenotípica das Estirpes Isoladas.

A caracterização morfológica possibilita um maior conhecimento da população de rizóbios presentes nos solos, e o agrupamento facilitará o desenvolvimento das etapas seguintes de confirmação da nodulação e seleção de colônias. Para realizar a classificação morfológica das colônias de rizóbios foram observadas as seguintes características: forma da colônia (puntiforme, circular, irregular), tamanho (grande: 5 mm ou mais; média: 2 a 5 mm; pequena: 2 mm ou menos), elevação (plana, elevada, convexa, pulvonada, umbonada e umbilicada), borda (inteira, ondulada, filamentosa, lobada, denteada), consistência do muco (viscosa, seca, gomosa), produção de muco (escasso, pouco, moderado, abundante), coloração (transparente; opaca), aspecto (viscosa; úmida; membranosa, gelatinosa e leitosa) e elasticidade do muco (figura 4) (JÚNIOR et al., 2009). A verificação da taxa de crescimento considerou o tempo do aparecimento de colônia no terceiro campo, classificando em estirpes de crescimento rápido (CR): 1-3 dias de crescimento, estirpes de crescimento intermediário (CI): 4-5 dias de crescimento, e estirpes de crescimento lento (CL): 6-10 dias de crescimento (HUNGRIA; ARAUJO, 1994), alteração do meio de cultura pelas bactérias e também características fisiológicas tais como a formação de ácido e álcalis no meio de cultura YMA (AC: ácida; AL: alcalina; NT: neutra), (SILVA et al., 2007). Para a obter o inoculante as colônias de bactérias puras foram colocadas em tubos de ensaio com meio YMA líquido (semissólido) e incubados por um período de 10 dias para que ocorra a multiplicação das bactérias.

Figura 4. Características morfológicas das colônias de rizóbios em relação a sua forma (A), elevação(B), borda (C), aspectos da superfície (D) e produção de muco (E).



Fonte: (JÚNIOR et al., 2009).

4.3 Testar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio

Para a avaliação da resposta à eficiência da fixação biológica de nitrogênio em plantas, foi feita a preparação dos vasos utilizando garrafas de vidro recobertas com papel alumínio (figura 4), onde foram fixadas tiras de filtro de papel para garantir o molhamento das sementes e plântulas através de capilaridade. O interior das garrafas continha solução nutritiva de HOOGLAND adaptada (tabela 3), posteriormente autoclavadas. As sementes foram pré-germinadas (figura 6-A), em seguida, colocadas na abertura do recipiente (figura 6-B), onde terão acesso a solução nutritiva pelas raízes através das fitas de papel. A inoculação foi feita com 1 ml de meio de cultura líquido YMA contendo o agente biológico previamente crescidos (figura 6-C e D). posteriormente as garrafas foram acondicionadas em casa de vegetação (figura 6-E) por 35 dias.

Tabela 2. Composição da solução nutritiva de Hoogland.

Solução Estoque	Solução Nutritiva de Hoogland 1/4	
	completa – 4L	S/ Nitrogênio – 4L
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 236,16g	4 ml	0,40 ml
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 115,03 g/L	1 ml	0,10 ml
KNO_3 – 101,11g/L	6 ml	0,60 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 12,6 g/L	2 ml	2 ml

K_2SO_4 – 87,13g/L	0	3 ml
$Ca_1(H_2PO_4)_2H_2O$ – 12,6g/4L	0	10 ml
$CaSO_2H_2O$ – 0,43 g/L	0	0,086g
Micronutrientes	1 ml	1 ml
$FeCl_3$ (10%) ou FeEDTA	10 ml ou 1 ml	10 ml ou 1 ml

Solução de Micronutrientes

Reagentes	Quantidade
H_3BO_3	2,86 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08g
H_2MoO_4 ou MoO_3	0,02g ou 0,016g

(HOAGLAND; ARNON, 1950)

Figura 5. Preparo dos vasos para a inoculação das bactérias em meio líquido.



Fonte: próprio autor

Figura 6. Preparo do experimento em casa de vegetação. A. Sementes pré germinadas em placas; B. Semente posicionada na abertura da garrafa; C. Recipientes prontos para receber o agente biológico; D. plantas separadas por bloco; E. experimento instalado em casa de vegetação.



Fonte: próprio autor

4.4 Análise estatística.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo adotados os seguintes tratamentos: i) controle inoculado com uma estirpe aprovada pelo Ministério da agricultura, para inoculação em caupí, catalogada pela Universidade Federal de Lavras (UFLA 0384); ii) tratamento controle sem agente fixador e sem adição de N mineral; iii) tratamento controle com adição de N mineral e iv) os tratamentos com a inoculação das estirpes isoladas considerando cada estirpe um tratamento. Cada tratamento recebeu três repetições. As avaliações morfológicas das plantas foram feitas durante a colheita do experimento, 35 dias após a inoculação, sendo avaliadas as seguintes variáveis: teor de clorofila (CLO A e B), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), peso seco dos nódulos (MSN), massa seca da raiz (MSR).

A leitura do teor de clorofila foi determinada em campo no momento da colheita aos 35 dias após a inoculação com o emprego do ClorofiLOG® modelo CFL 1030.

A eficiência relativa (Efr) foi calculada pela razão entre a massa de matéria seca da parte aérea (MSPA) dos tratamentos inoculados e a média da massa de matéria seca da parte aérea do tratamento com nitrogênio N, multiplicada por 100, segundo a equação (Bergersen et al., 1971).

$$Efr = \frac{MSPA}{MSPA \text{ da testemunha com N mineral}} \times 100$$

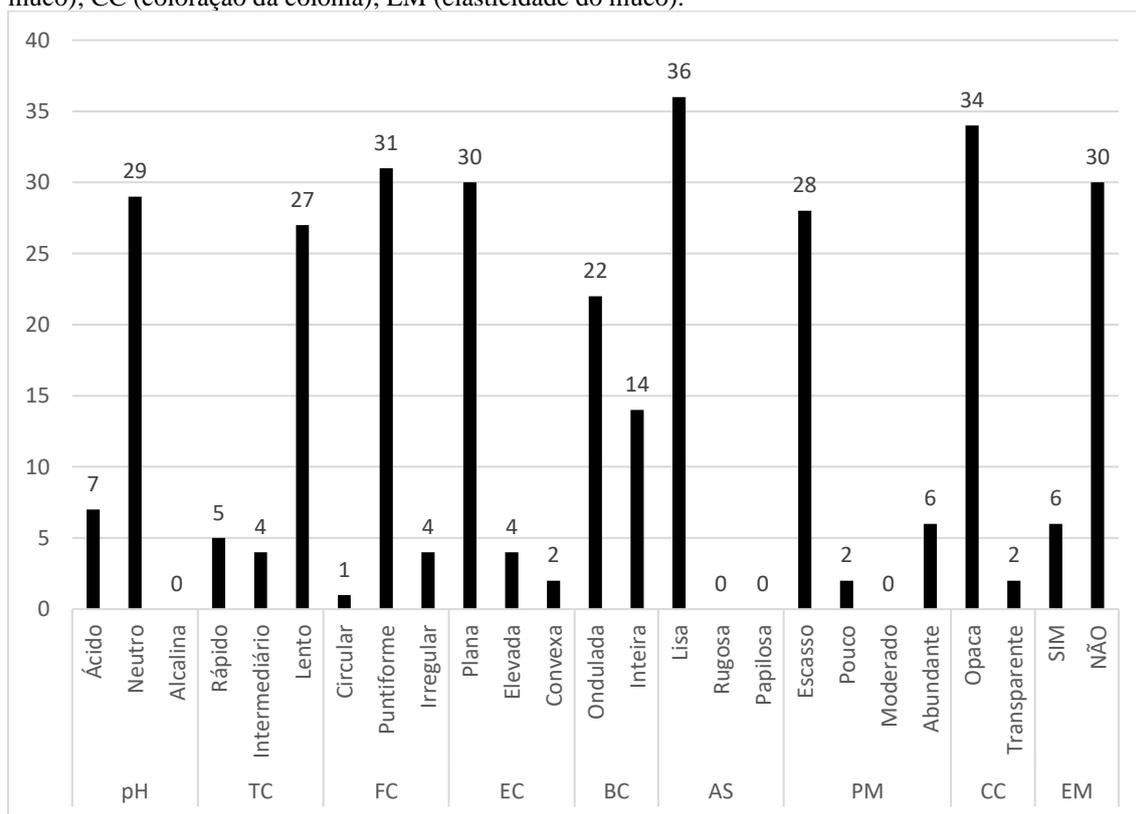
Para a análise estatística dos dados, primeiramente será verificada a normalidade e a homogeneidade dos dados. Após o diagnóstico, os dados serão submetidos ao teste T da análise de variância. Quando o valor de T foi significativo a 5% de probabilidade, aplicar-se-á o teste de Scott-Knott para comparação das médias dos tratamentos, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA 2008).

5. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização fenotípica das estirpes

Ao todo, foram isoladas 36 colônias de bactérias nos 6 (seis) pontos de coleta de *Vigna unguiculata*. A maioria dos nódulos apresentou duas ou mais colônias no processo de isolamento, indicando que a planta pode apresentar variadas associações com bactérias diferentes. Através da caracterização fenotípica e morfológica das colônias, verificou-se que há 4 (quatro) estirpes de crescimento rápido, 5 (cinco) de crescimento intermediário e 27 (vinte e sete) de crescimento lento (figura7).

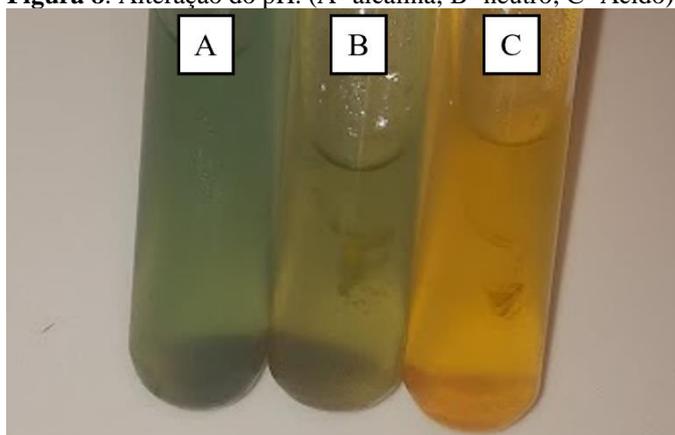
Figura 7. Características morfofisiológicas das culturas de bactérias isoladas dos nódulos feijão de praia coletados as margens do Rio Juruá, Cruzeiro do Sul-Acre. pH; TC (tempo de crescimento); FC (forma da colônia); EC (elevação da colônia); BC (borda da colônia); AS (aspecto da superfície); PM (produção de muco); CC (coloração da colônia); EM (elasticidade do muco).



Analisando a alteração do pH do meio (figura 8), das 36 estirpes isoladas, 7 apresentaram uma reação ácida, enquanto 29 demonstraram uma reação neutra, e nenhuma apresentou alcalinidade em meio YMA com Azul de bromotimol (conforme Figura 7). Dos morfotipos investigados, 5 demonstraram crescimento rápido, enquanto 31 exibiram crescimento intermediário ou lento (conforme Tabela 3), indicando

características consistentes com o gênero *Bradyrhizobium*, que geralmente exibe um padrão de crescimento intermediário a lento (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Apenas 5 das estirpes isoladas apresentaram crescimento rápido, de 24 à 72 horas. Em relação ao diâmetro das colônias (Tabela 3), as estirpes que obtiveram o maior valor de crescimento 0,9 cm, foram ISO06 e ISO22 ambas de crescimento intermediário e pH do meio ácido, seguida pela estirpe ISO21 (0,8 cm) de crescimento intermediário e pH ácido, e ISO12 de 0,2 cm, apresentando crescimento rápido e pH neutro.

Figura 8. Alteração do pH. (A- alcalina; B- neutro; C- Acido)



Fonte: próprio autor

Tabela 5.1 Crescimento, diâmetro e alteração do pH das colônias isoladas dos nódulos de plantas de feijão-caupi coletadas em cultivo de praia.

Cepas	Crescimento			Tamanho cm	Alteração do pH		
	Rápido	Intermediário	Lento		Acido	Neutro	Básico
ISO01	-	x	-	0,1	x	-	-
ISO02	-	x	-	0,1	x	-	-
ISO03	-	-	x	0,1	-	x	-
ISO04	-	-	x	0,1	-	x	-
ISO05	-	-	x	*	-	x	-
ISO06	-	-	x	0,9	x	-	-
ISO07	-	-	x	*	-	x	-
ISO08	-	-	x	*	-	x	-
ISO09	x	-	-	0,1	-	x	-
ISO10	x	-	-	0,1	-	x	-
ISO11	x	-	-	0,1	-	x	-
ISO12	x	-	-	0,2	-	x	-
ISO13	-	-	x	0,1	-	x	-
ISO14	-	-	x	0,1	-	x	-
ISO15	-	-	x	*	-	x	-
ISO16	-	-	x	*	-	x	-
ISO17	-	-	x	*	-	x	-
ISO18	-	-	x	*	-	x	-
ISO19	-	-	x	*	-	x	-

ISO20	-	-	X	*	-	X	-
ISO21	-	X	-	0,8	X	-	-
ISO22	-	X	-	0,9	X	-	-
ISO23	-	-	X	*	-	X	-
ISO24	-	-	X	*	-	X	-
ISO25	-	-	X	0,1	-	X	-
ISO26	-	-	X	0,1	-	X	-
ISO27	-	-	X	0,1	-	X	-
ISO28	-	-	X	0,1	-	X	-
ISO29	-	-	X	*	-	X	-
ISO30	-	-	X	*	-	X	-
ISO31	-	-	X	*	-	X	-
ISO32	-	-	X	*	-	X	-
ISO33	-	-	X	*	-	X	-
ISO34	-	-	X	*	-	X	-
ISO35	-	-	X	*	X	-	-
ISO36	-	-	X	*	X	-	-

*: menor que 0,1cm

Características como crescimento rápido, manutenção do pH neutro do meio de cultura e produção de muco, estão associadas a estirpes em situação de escassez hídricas (JORDAN, 1982). Estudos em regiões semiáridas verificaram a predominância de bactérias de crescimento rápido utilizando feijão caupi como planta isca (LEITE et al., 2009). Segundo Sprent (1994), os rizóbios de crescimento rápido são habituais em regiões áridas e semiáridas, caracterizando uma tática de sobrevivência nessas condições. Tal fator ocorre devido aos rizóbios de crescimento rápido que são mais tolerantes à seca do que os de crescimento lento, que crescem rapidamente em um curto período.

A produção de muco é um atributo da maioria das bactérias de crescimento rápido e geralmente do tipo viscoso. De acordo com Coutinho et al. (COUTINHO et al., 1999), essa característica está associada ao mecanismo de resistência e adaptação das bactérias as condições adversas do solo e do clima. Características como rápido crescimento, reação ácida do meio de cultura e produção de muco, vêm sendo descritas como mecanismos envolvidos no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios de regiões tropicais, submetidos a características de elevadas temperaturas e seca (SANTOS et al., 2007). A região da amostragem apresenta fatores que corroboram com a presença dessas bactérias, onde o plantio do feijão-caupi é efetuado no período de seca, com níveis de pluviosidade baixíssimos e temperaturas elevadas (JESUS et al., 2016).

5.2 Experimento em casa de vegetação

As médias resultados para a leitura do teor de clorofila aos 40 dias, massa fresca e seca da parte aérea, raízes, número de nódulos e massa seca de nódulos, foram apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Análise de variância

TRAT	MFPA	MSPA	CLOA	CLOB	NN	MSN	MSR
COM N	3,458 a	0,731 a	29,3 b	10,2 a	0 a	0 a	0,51 c
SEM N	0,943 a	0,104 a	8,8 a	2,1 a	0 a	0 a	0,11 a
UFLA	2,35 a	0,504 a	23,9 b	7,6 a	62 b	0,043 a	0,156 a
ISO01	2,18 a	0,264 a	31,1 b	7 a	22 a	0,025 a	0,175 a
ISO02	2,35 a	0,319 a	13,4 a	2,8 a	10 a	0,005 a	0,237 a
ISO03	2,755 a	0,42 a	24,1 b	6 a	19 a	0,035 a	0,211 a
ISO04	3,03 a	0,507 a	36,4 b	12,5 a	68 b	0,028 a	0,166 a
ISO05	1,38 a	0,184 a	10,6 a	2,5 a	24 a	0,03 a	0,184 a
ISO06	1,736 a	0,2 a	14,3 a	3,1 a	8 a	0,022 a	0,139 a
ISO07	2,421 a	0,43 a	19,7 b	5,1 a	12 a	0,038 a	0,307 b
ISO08	2,22 a	0,25 a	19,1 b	5,4 a	21 a	0,018 a	0,182 a
ISO09	2,86 a	0,435 a	16,2 a	3,7 a	11 a	0,073 a	0,206 a
ISO10	2,241 a	0,261 a	21,3 b	5,5 a	6 a	0,017 a	0,106 a
ISO11	1,91 a	0,244 a	19,4 a	5,1 a	30 b	0,005 a	0,14 a
ISO12	1,41 a	0,185 a	25,4 b	6,4 a	18 a	0,027 a	0,174 a
ISO13	1,97 a	0,206 a	25,8 b	6,6 a	67 b	0,034 a	0,189 a
ISO14	2,392 a	0,375 a	20,4 b	5,9 a	24 a	0,039 a	0,188 a
ISO15	2,922 a	0,347 a	30,9 b	10,4 a	63 b	0,018 a	0,139 a
ISO16	3,24 a	0,375 a	33,6 b	8,9 a	33 a	0,056 a	0,183 a
ISO17	2,21 a	0,366 a	22,2 b	6 a	39 b	0,002 a	0,234 a
ISO18	2,35 a	0,306 a	25,6 b	8,1 a	36 a	0,043 a	0,201 a
ISO19	2,654 a	0,437 a	22,6 b	6,9 a	22 a	0,02 a	0,235 a
ISO20	1,364 a	0,23 a	15,4 a	4,5 a	21 a	0,039 a	0,151 a
ISO21	2,497 a	0,43 a	26,8 b	5,9 a	52 b	0,029 a	0,235 a
ISO22	2,205 a	0,401 a	15,7 a	3,1 a	8 a	0,026 a	0,255 a
ISO23	2,548 a	0,399 a	26,9 b	9,5 a	53 b	0,08 a	0,205 a
ISO24	2,652 a	0,358 a	19,9 a	4,3 a	31 a	0,051 a	0,132 a
ISO25	1,89 a	0,233 a	28,4 b	13,5 a	39 a	0,042 a	0,097 a
ISO26	1,62 a	0,257 a	14,1 a	2,7 a	24 a	0,015 a	0,233 a
ISO27	2,66 a	0,327 a	28,6 b	7,8 a	62 b	0,054 a	0,239 a
ISO28	2,318 a	0,364 a	29,6 b	10,1 a	67 b	0,02 a	0,144 a
ISO29	1,29 a	0,17 a	14 a	6,2 a	58 b	0,024 a	0,081 a
ISO30	0,98 a	0,2 a	24,4 b	6,5 a	15 a	0,025 a	0,266 b
ISO31	2,68 a	0,497 a	17,9 a	5 a	57 b	0,029 a	0,32 b
ISO32	3,18 a	0,606 a	27,3 b	7,6 a	31 a	0,057 a	0,223 a
ISO33	1,24 a	0,275 a	26,1 b	7,7 a	27 a	0,036 a	0,184 a
ISO34	1,97 a	0,294 a	19 a	4,2 a	38 a	0,048 a	0,284 a
ISO35	2,66 a	0,381 a	24,7 b	5,4 a	98 b	0,055 a	0,22 a
ISO36	2,276 a	0,367 a	22,6 a	6,1 a	40 b	0,034 a	0,257 b
CV(%)	115,44	48,94	31,39	48,18	55,11	156,61	39,49

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Nos resultados referentes ao teor de clorofila, para os tratamentos inoculados, o que mais se destacou foi ISO04, com média de 36,4, equivalente a 124% da leitura observada tratamento adubado, o qual apresentou o valor 29,3, mostrando a efetividade na fixação de nitrogênio. Em seguida os resultados mais satisfatórios para os tratamentos inoculados foram proporcionados pelas estirpes ISO01, ISO15, ISO16 e ISO28, respectivamente.

Singh et al., (2023) cultivando feijoeiro comum encontraram índices semelhantes quanto ao teor de clorofila quando adubado com doses altas de nitrogênio. Porém a fixação de nitrogênio pode variar muito dependendo da espécie da cultura.

Conforme descrito por Nascimento (2009), o índice de clorofila representa uma característica de grande relevância, pois é através dele que se avalia a capacidade da planta em absorver a radiação solar por meio das folhas. Aumentos na eficiência desse processo implicam em taxas fotossintéticas elevadas, o que se traduz em maior produtividade de grãos.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos em relação à massa seca da parte aérea. A maior produção foi registrada no tratamento adubado, com média de 731mg, enquanto a menor produção foi observada no tratamento controle, com 104mg.

Quanto aos tratamentos inoculados, o que mais se destacou foi o inoculante com ISO32, com 606mg, e o ISO04, com 507mg, o que equivale a 83% e 69% em relação ao tratamento nitrogenado.

Resultados congruentes foram identificados por Kyei-Boahen et al. (2017), os quais não evidenciaram diferenças significativas entre os tratamentos inoculados e o tratamento adubado.

Bello et al. (2018) não observaram diferença estatisticamente significativa para a Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) em feijão caupi inoculado com agente biológico comercial ao comparar os tratamentos adubado e controle. Este resultado reforça a habilidade da população natural de rizóbios do solo em estabelecer uma simbiose eficaz e fornecer o nitrogênio essencial para o crescimento ótimo da cultura.

Zilli et al. (2009), ao conduzirem um estudo sobre o cultivo de feijão-caupi em áreas de cerrado e de mata, observaram que a produção de massa seca da parte aérea foi superior na área de mata.

Ferreira et al. (2011), em sua pesquisa sobre o cultivo de feijão-caupi, constataram que em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, as estirpes BR3270, BR3289 e

BR200 resultaram em maiores produções de massa seca da parte aérea em comparação com o tratamento que recebeu adubação com nitrogênio mineral.

Zilli et al. (2011), realizando experimentos de cultivo de feijão-caupi em casa de vegetação, obtiveram resultados superiores de massa seca da parte aérea em tratamentos inoculados com estirpes recomendadas para o feijão-caupi.

A distribuição de massa seca na planta é uma variável que proporciona uma análise detalhada de um processo pouco estudado, a translocação de foto assimilados, sendo frequentemente essencial para compreender a resposta das plantas em relação à produtividade (BENINCASA, 2003). Conforme Gualter et al. (2011), as bactérias fixadoras de nitrogênio têm o potencial de contribuir significativamente para um maior fornecimento de nitrogênio para as plantas, resultando conseqüentemente em um aumento da massa seca da planta.

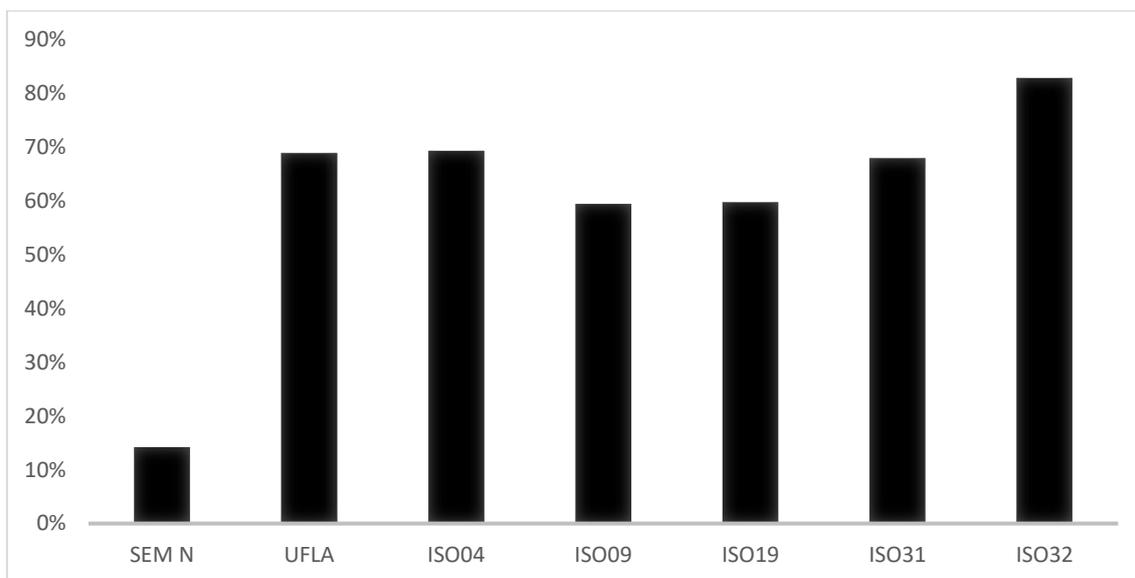
Em relação à massa seca de raiz, o tratamento que apresentou maior resultado foi a ISO31, com 32mg o que equivale a 63% em relação a ao tratamento nitrogenado, porém não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos tratamentos controles (Tabela 5).

Para a variável número de nódulos, foi observado que o tratamento ISO35 proporcionou a maior produção, com uma média de 98 nódulos, não apresentando diferença estatística significativa em comparação com o tratamento controle UFLA 0384, que registrou uma média de 62 nódulos. Outros tratamentos também apresentaram desempenho superior em relação ao tratamento controle: ISO04, ISO13, ISO28 e ISO15, com 68, 67, 67 e 63 nódulos, respectivamente. Cabral et al. (2021), encontraram resultados semelhantes em com cepas comerciais, indicando um potencial as estirpes isoladas no estudo.

Para a massa seca dos nódulos não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos (Tabela 5). O tratamento com a estirpe ISO23 representou os maiores valores para essa variável com a média de 0,80mg, enquanto, a estirpe controle UFLA, obteve o valor 0,43mg.

Em relação à eficiência relativa das estirpes, a qual compara a produção média da massa seca da parte aérea dos tratamentos com a inoculados isolados e testemunhas, é possível observar que a estirpe que apresentou maior eficiência foi o tratamento ISO32 com média de 606 mg, equivalente a 83% com relação ao tratamento nitrogenado, mostrando a eficiência da estirpe se comparada a eficiência da estirpe comercial da UFLA (0384), (figura 9).

Figura 9. Eficiências relativa das cepas das cepas com melhor desempenho.



Esses resultados mostram que a fixação biológica atendeu em aproximadamente 85% as necessidades de essa cultivar.

6. CONCLUSÃO

Os resultados da análise das características fenotípicas das cepas bacterianas isoladas revelaram uma série de características morfológicas e fisiológicas, com uma taxa de crescimento média a lenta típica das espécies de *Bradyrhizobium*. A análise do pH do meio indicou predominância de neutra.

Experimento em casa de vegetação, os tratamentos inoculados, especialmente ISO04, demonstraram eficácia notável na fixação de nitrogênio, como evidenciado pelos níveis de clorofila. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na massa seca da parte aérea, as estirpes ISO32 e ISO04 apresentaram desempenho superior ao controle adubado apenas com nitrogênio mineral. Esses resultados corroboram estudos anteriores e ressaltam o potencial das estirpes isoladas para melhorar a eficiência da simbiose com as plantas de feijão-caupi, comparativamente às estirpes comerciais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDA, B.; SIHEM, T.; INES, B.; HATEM, L. Biochemical variability and functional properties of cowpea landraces grown in Hoggar: the Algerian arid region. **Food Measure** **15**, 3509–3522 (2021).
- ANDRADE, M.; MORAIS, M.; MUNHÃO, E; PIMENTA, P. Controle de custos na agricultura: um estudo sobre a rentabilidade na cultura da soja. 2011.
- ALVES, B. J. R. et al. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 449–456, 2006.
- AMAZONAS, L. Análise Mensal de soja. **Conab**, n. 61, p. 1–3, 2018.
- ANPII. **Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes**.
- AURAS, N. É.; AMÂNCIO, C. O. DA G. Cultivo de feijão-caupi em municípios dos estados do Norte, Nordeste e Centro-Oeste, conforme a área colhida produtividade. **Embrapa Agrobiologia**, 2015.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas - noções básicas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41 p.
- GONÇALVES BARROS, Manuela; ANDRADE ROCHA, Thalita Maria. O value relevance das informações divulgadas na DVA das empresas do setor do agronegócio listadas na B3. **Revista de Contabilidade & Controladoria**, v. 14, n. 2, 2022.
- BASSAN, D. A. Z. et al. Inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: produção e qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 76–83, 2001.
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Boletim da Safra 2021/2022**, v. 9, n. Terceiro levantamento, p. 60, 2022. Conab – Companhia Nacional de Abastecimento – Informações Agropecuárias Safra. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>> acesso: maio de 2023.

COUTINHO, H. L. C. et al. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 2, p. 159–167, 1999.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos. V. 7, Safra 2019/2020, n.9 – Nono levantamento/junho 2020.

CRUZ, José Elenilson; MEDINA, Gabriel da Silva; MACEDO, Luís Otávio Bau (Org.).

Estudos em agronegócio: competitividade, mercados e ambiente constitucional. Goiânia: Kelps, 2019.

Deral/Seab – Previsão de safras. Disponível em: <<https://www.agricultura.pr.gov.br/deral/safras>> Acesso: maio de 2023.

D’ANDREA, A., KAHLHEBER, S., LOGAN, A., WATSON, D. (2007) Early domesticated cowpea (*Vigna unguiculata*) from central Ghana | Amanda Logan –Academia.edu. **Antiquity** 81 (313), 686–696.

DOYLE, J.J. (1994) Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. **Annu Rev Ecol Evol Syst** 25: 325–349.

EMBRAPA. Anais da XIX RELARE. 2019.

FAGAN, E. B. et al. FISIOLÓGIA DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOYBEAN - A REVIEW. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 155–163, 2007.

FAO. **World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020.**

FILGUEIRAS, G. C. Aspectos socioeconômicos. n. December, 2009.

FILHO, F. R. F. et al. Avanços e perspectivas para a cultura de feijão-caupi. In: **Agricultura tropical: Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas.** [s.l: s.n.]. p. 235–350.

FREIRE FILHO, R. F. **Feijão-Caupi no Brasil.** [s.l: s.n.] Embrapa Meio-Norte Teresina, PI 2011.

GIARDINI, A. R.; LOPES, E. S.; DEUBER, R. Influência de herbicidas na nodulação da soja (*Glycine max* L. Merr.). **Planta Daninha**, v. 2, n. 1, p. 21–32, 1979.

GOYAL, R. K.; SCHMIDT, M. A.; HYNES, M. F. Molecular biology in the improvement of biological nitrogen fixation by rhizobia and extending the scope to cereals. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1–24, 2021.

GUALTER, R. M. R; BODDEY, R. M; RUMJANEK, N. G; FREITAS, A. C. R; XAVIER, G. R. Eficiência agrônômica de estirpes de rizobio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazonia maranhense. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.

HARLAN, J.R., 1971. Agricultural origins: centers and noncenters. **Science** 174, 468–474.

HARA, F. A. DOS S. et al. Avaliação de cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) em um solo de várzea no município de Autazes/AM. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e16511729865, 2022.

HEATH, K. D.; TIFFIN, P. Stabilizing mechanisms in a legume-rhizobium mutualism. **Evolution**, v. 63, n. 3, p. 652–662, 2009a.

HEATH, K. D.; TIFFIN, P. Stabilizing mechanisms in a legume-rhizobium mutualism. **Evolution**, v. 63, n. 3, p. 652–662, 2009b.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. Preparing the nutrient solution. **The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil**, v. 347, p. 29–31, 1950.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. ESTUDOS SOBRE A ASSOCIAÇÃO RIZÓBIO-LEGUMINOSAS. In: **MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA aGRÍCOLA**. [s.l: s.n.].

HUNGRIA, M. et al. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 393–399, 1998.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Fixação Biológica Do Nitrogênio Na Cultura Da Soja. **Embrapa Soja. Circular Técnica**, 35, p. 48, 2001.

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

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. 80p. (Documentos, 283).

IBGE. Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. **Censo agropecuário**, v. 8, p. 1–105, 2019.

JENSEN, E. S. Inoculation of pea by application of Rhizobium in the planting furrow. **Plant and Soil**, v. 97, n. 1, p. 63–70, 1987.

JESUS, J. C. S. DE et al. **Sistemas produtivos utilizados no Vale do Juruá**. [s.l: s.n.].

JORDAN, D. C. Transfer of Rhizobium japonicum Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 136–139, 1982.

JOHN, D.A.; BABU, G.R. Lessons From the Aftermaths of Green Revolution on Food System and Health. *Front Sustain Food Syst.* 2021 Feb 22;5:644559. doi: 10.3389/fsufs.2021.644559.

JÚNIOR, C. R. DA C. et al. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS EM NÓDULOS DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS. p. 6–8, 2009.

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 Ciencia do Solo**, v. 33, n. 5, p. 1215–1226, 2009.

LIBA, C. M. et al. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 5, p. 1076–1086, 2006.

LOPES, M. A. Os insumos biológicos na agricultura do futuro. p. 2018, 2018.

LUSH, W., EVANS, L., 1981. The domestication and improvement of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Euphytica** 30, 579–587.

MAPA. Instrução Normativa Sda N° 13, De 24 De Março De 2011. **Diário oficial da União**, n. 1677-7042-N° 58, p. 1–24, 2011.

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

MATTAR, E. P. L. et al. **Feijões do Vale do Juruá**. [s.l: s.n.].

MELLONI, R. et al. Mycorrhiza formation on olive varieties (*Olea europaea* L.) fit for cultivation in the state of Minas Gerais. **Ciencia Florestal**, v. 30, n. 4, p. 1255–1265, 2020.

MELO, S. R. DE; ZILLI, J. É. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **agropec. bras., Brasília**, n. 1, p. 1177–1183, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. [s.l: s.n.].

OLIVEIRA, E. DE et al. Descrição de cultivares locais de feijão-caupi coletados na microrregião Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 3, p. 243–254, 2015.

OLIVEIRA, E. DE et al. Feijão - Aspectos econômicos. In: **FEIJÕES DO VALE DO JURUÁ**. [s.l: s.n.]. p. 111–118.

PALIWAL, R.; ABBERTON, M.; FALOYE, B.; OLANIYI, O. Developing the hole of legumes in West Africa under climate change. *Plant Biology*. Volume 56, August 2020, p. 242-258. <https://doi.org/10.106/j.pbi.2020.05>.

RUMJANEK, N. G. et al. Feijão Caupi tem uma Nova Recomendada como Inoculante Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 2006.

SANTOS, C. E. R. E S. et al. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 2, 2005.

SANTOS, C. E. R. S. et al. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, n. 4, p. 249–256, 2007.

SILVA, J. R. DOS S. et al. Caracterização Temporal Da Precipitação Pluviométrica Na Cidade De Cruzeiro Do Sul, Acre, Brasil. **UÁQUIRI - Revista do Programa de Pós Graduação em Geografia da Universidade Federal do Acre**, v. 3, n. 1, p. 12, 2021.

SILVA, V. N. et al. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 1, p. 16–21, 2007.

SILVEIRA, A. P. D. DA; FREITAS, S. DOS S. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. [s.l: s.n.]. v. 2

SIVIERO, A. et al. Feijões do vale do Juruá. In: **Feijões do vale do juruá**. [s.l: s.n.]. p. 28.

SNYDER, C. S.; BRUULSEMA, T. W.; JENSEN, T. L. Melhores práticas de manejo para minimizar emissões de gases de efeito estufa associadas ao uso de fertilizantes. **Informações Agronômicas**, v. 121, p. 13–15, 2008.

SPRENT, J. I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, v. 161, n. 1, p. 1–10, 1994.

VANLAUWE, B.; HUNGRIA, M.; KANAMPIU, F.; GILLER, K.E. The hole of legumes in the sustainable intensification of African smallholder agriculture: lessons learnt and challenges for the future. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. Vol. 284, 15 november 2019. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106583>

VIEIRA NETO, S. A. et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 861–870, 2008.

ZILLI, J. É. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de Bradyrhizobium isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41(5), n. 1, p. 811–818, 2006.

ZILLI, J. É. et al. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão- caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 749–758, 2009.