

## Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte

Erika Valente de Medeiros<sup>1\*</sup>, Claudia Miranda Martins<sup>2</sup>, José Arcanjo Melo Lima<sup>3</sup>, Ykesaky Terson Dantas Fernandes<sup>3</sup>, Vianney Reinaldo de Oliveira<sup>3</sup> e Wardsson Lustrino Borges<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Av. do Bom Pastor, 55296-901, Garanhuns, Pernambuco, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. <sup>4</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: evmbio@gmail.com

**RESUMO.** Em função das características nutricionais e de rusticidade, o feijão-caupi tornou-se importante fonte de proteína na Região Nordeste do Brasil. O caupi se beneficia da fixação biológica de nitrogênio e pode receber parte do nitrogênio necessário para a cultura via simbiose, o que reduz os custos de produção. Um experimento em condições de casa-de-vegetação foi conduzido com o objetivo de avaliar a diversidade de isolados de rizóbio de nódulos de caupi em solos do Estado do Rio Grande do Norte. Os nódulos foram coletados de raízes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., utilizada como planta-isca, sendo obtidos 304 isolados com características típicas de rizóbio. Embora todos os isolados tenham apresentado crescimento rápido e ácido em meio de cultivo, os isolados apresentaram elevada diversidade morfológica e foram agrupados em 18 grupos morfológicos. Não foi observada diferença de diversidade de isolados de rizóbio entre as diferentes amostras de solo analisadas.

**Palavras-chave:** fixação biológica de nitrogênio, *Vigna unguiculata*, semi-árido.

**ABSTRACT. Morphological diversity of rhizobia from cowpea cultivated in Rio Grande do Norte State soils.** As a result of its nutritional and rustic characteristics, cowpea has become an important source protein in the Northeast region of Brazil. Cowpea may benefit from biological nitrogen fixation and can receive part of the nitrogen needed for culture from symbiosis, which reduces the cost of production. An experiment in greenhouse conditions was carried out in order to assess the diversity of rhizobia isolates of the nodules of cowpea, in soils from Rio Grande do Norte State. The nodules were obtained from roots of *Vigna unguiculata* (L.) Walp., a species used as trap plant; 304 isolates with typical rhizobial features were obtained. Although all isolates showed rapid and acid growth in the medium, the isolates showed high morphological diversity, forming 18 clusters. No diversity differences of rhizobial isolates were observed among the different soil samples studied.

**Key words:** biological nitrogen fixation, *Vigna unguiculata*, semi-arid.

### Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), mais comumente conhecido como feijão-de-corda, macassar ou fradinho, vem se tornando produto de importância agrícola pelas suas características nutricionais, com elevado valor protéico, energético, vitamínico, mineral, apresentando todos os aminoácidos essenciais à alimentação humana, com grande quantidade de fibras e baixo teor de gordura. Em função destas características, tornou-se um dos principais produtos da dieta brasileira. Trata-se de uma leguminosa que se adapta bem às condições edafoclimáticas do Nordeste brasileiro, tais como temperaturas elevadas, baixa pluviosidade, solos com baixa fertilidade, pH e

salinidade elevados, o que o torna um dos principais produtos de subsistência para populações de baixa renda (FREIRE FILHO, 2005).

O Norte e o Nordeste brasileiros são responsáveis por 70% da produção nacional, com uma produtividade média de 400 kg ha<sup>-1</sup>. Estima-se que a cultura seja responsável pela criação de 1,36 milhões de empregos e pela alimentação de 23 milhões de brasileiros (FREIRE FILHO, 2005). Essa produção baixa se deve ao tipo de sistema de produção adotado por pequenos agricultores, em regime de subsistência, com pouca tecnificação. Entretanto, em campos experimentais, pode-se observar que a produção pode ser maior (MARTINS et al., 2003).

Alguns autores defendem adubação nitrogenada, como Franco et al. (2008) na qual afirma que a produtividade de grãos do feijoeiro aumenta em até 156,48% na aplicação em semeadura e/ou cobertura em sistemas de plantio direto. Entretanto, essa é uma prática que eleva os custos da produção, não sendo alternativa economicamente viável para a maioria dos produtores de feijão que plantam em regime de subsistência.

Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de melhorar a produtividade e qualidade do caupi. Dentre essas tecnologias, destaca-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN) que vem ganhando espaço entre os grandes produtores agrícolas, principalmente nos Cerrados dos Estados do Piauí e Maranhão, áreas onde a implantação da biotecnologia já vem sendo realizada (ZILLI et al., 2006). A FBN é uma alternativa almejada ao fornecimento de N às plantas, pois este é o nutriente que mais limita a produtividade agrícola.

Algumas plantas da família Leguminosae podem obter até 100% da sua demanda de N via FBN. Na cultura da soja, caso de maior sucesso em FBN, o Brasil vem economizando, pela substituição de fertilizantes nitrogenados por inoculantes com estirpes eficientes, cerca de US\$ 3 bilhões anualmente (HUNGRIA et al., 2005). Na ausência de adubação nitrogenada, mas em associação com rizóbio, o feijão comum obtém rendimentos de até 1.600 kg ha<sup>-1</sup>. Para a cultura do caupi, ganhos de produtividade da ordem de 30% têm sido observados (MARTINS et al., 2003). Alguns autores também têm buscado incremento na produção de amendoim via FBN (SANTOS et al., 2005; BORGES et al., 2007).

O clima do Rio Grande do Norte é classificado como BSw<sub>h</sub> (Köppen), isto é, seco e muito quente, com duas estações climáticas definidas, uma seca e outra chuvosa, apresentando temperatura média anual de 27,4°C e precipitação pluviométrica anual irregular, com média de 673 mm, e umidade relativa de 68,9%. Fatores como temperatura, características genéticas inerentes aos simbiontes, bem como sua interação com características edafoclimáticas influenciam a persistência dos rizóbios no solo, limitando tanto a nodulação quanto à fixação do nitrogênio (HUNGRIA; VARGAS, 2000; FERREIRA et al., 2000). Para superar essas limitações, torna-se de grande importância a escolha de estirpes nativas de rizóbio da área que será inoculada.

A diversidade de rizóbios nativos é de suma importância, sendo uma fonte de recursos genéticos para seleções de isolados adaptados às diversas condições. Por outro lado, podem, por meio da competitividade de sítios de nodulação, interferir na ocupação nodular das estirpes inoculadas. O sistema

de taxonomia microbiana atual aborda uma análise conjunta de dados de morfologia, fisiologia, sorologia e diferentes ferramentas baseadas nos ácidos nucleicos, utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e das similaridades entre os microrganismos, e fornece, assim, medidas quantitativas de similaridade entre microrganismos. As ferramentas moleculares permitiram nos últimos anos mudanças na taxonomia dos rizóbios e identificação de novos grupos de bactérias capazes de induzir nódulos em leguminosas (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2005). Entretanto, a avaliação das características culturais e morfológicas é o primeiro passo para a identificação de novos grupos taxonômicos de microrganismos e é muito útil em laboratórios que não têm acesso a tecnologias mais caras, pois essas avaliações são de baixo custo (JESUS et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade morfológica de rizóbios nativos isolados de nódulos radiculares de feijão-caupi cultivado em solos provenientes de seis municípios do Estado do Rio Grande do Norte.

## Material e métodos

As amostras de solo foram coletadas no período de dezembro de 2005 a janeiro de 2006, em seis áreas de Caatinga Potiguar, nos municípios de Alto do Rodrigues, Caicó, Carnaubás, Ceará-Mirim, Mossoró e Nova Esperança. As coletas foram realizadas na profundidade de 0-20 cm, e cada amostra composta foi constituída de dez amostras simples. Em seguida, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Agricultura Irrigada da Universidade Federal Rural do Semi-árido, sobre as quais se procedeu o cultivo de planta-isca.

Para obtenção dos isolados de rizóbio, foi realizado experimento em casa-de-vegetação, segundo delineamento inteiramente casualizado, sendo seis tratamentos constituídos pela procedência dos solos, com dez repetições, e a unidade experimental correspondente a um vaso com capacidade de 300 mL, com uma planta de feijão-caupi por vaso.

As sementes de caupi, previamente lavadas com etanol (100%; 30 s), desinfestadas superficialmente com peróxido de hidrogênio (5%; 3 min.) e lavadas por dez vezes sucessivas com água esterilizada, foram semeadas nos vasos. Após 30 dias da semeadura, as plantas foram coletadas, e os nódulos formados nas raízes foram guardados em recipientes contendo sílica gel, por um período máximo de uma semana.

Os nódulos obtidos foram reidratados por 1h., sendo lavados com etanol (100% por 30 s) a fim de reduzir a tensão superficial; em seguida, foi realizada a

desinfestação superficial com hipoclorito de sódio (5%; 4 min.) e lavagens sucessivas em água destilada estéril. A maceração e a repicagem das estrias foram realizadas em condições assépticas, em meio de cultura YMA (extrato de levedura, manitol e agar), utilizando um protocolo padrão de isolamento. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias, quando, então, foram repicadas e novamente incubadas, até obtenção de colônias puras.

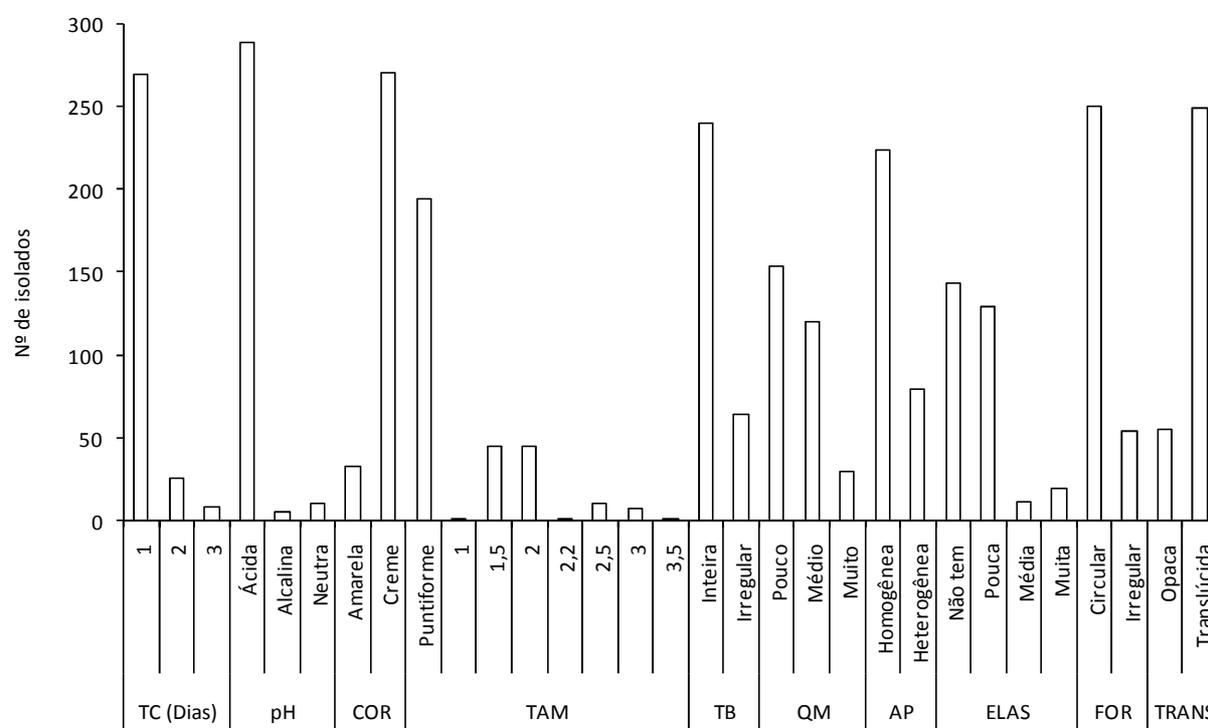
As placas foram observadas do primeiro dia após o plaqueamento até o aparecimento de colônias isoladas, quando se procedeu à caracterização morfológica. As variáveis analisadas foram: velocidade de crescimento das colônias isoladas (em dias); tipo de alteração do pH do meio após crescimento (avaliado pela alteração de cor do indicador); cor das colônias; diâmetro das colônias (mm); borda (inteira ou irregular); aparência da colônia (homogênea ou heterogênea); forma (circular ou irregular) e transparência (translúcida ou opaca). Quanto ao muco produzido pelas células, foram avaliados os aspectos: quantidade (muito ou pouco), obtido pela aderência à alça de platina quando da remoção do muco da superfície do meio de cultivo e elasticidade (sim ou não), observada pela formação ou não de fio, no momento da remoção das colônias do meio de cultura.

A partir dos dados da caracterização morfológica,

preparou-se uma matriz binária de dados. Esta foi utilizada para calcular a matriz de similaridade entre os isolados pelo coeficiente Simple Matching (SM); posteriormente, foi realizado o agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted pair-group method) dos isolados e realizada a plotagem em um dendrograma. Para esta análise, foi utilizado o programa Ntsys2.0 (ROHLF, 1994).

## Resultados e discussão

A partir dos nódulos coletados no experimento com caupi, foram obtidos 304 isolados com características típicas de rizóbio. Destes, 48 foram isoladas do solo coletado no município de Alto do Rodrigues, 42 de Caiacó, 36 de Carnaubás, 98 de Ceará-Mirim, 30 de Mossoró e 50 de Nova Esperança. Considerando toda a coleção, a maior parte dos isolados apresentou crescimento em um dia, acidificou o pH do meio de crescimento, apresentou colônia de coloração creme, borda inteira, homogênea, circular e translúcida. Foi observada maior variação entre os isolados para as características de quantidade e elasticidade do muco produzido, bem como para tamanho, embora a maior parte tenha apresentado colônias de tamanho classificado como puntiforme (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição dos isolados de rizóbio obtidos de nódulos radiculares de feijão-caupi, quanto às características morfológicas avaliadas de tempo de crescimento em dias (TC); alteração de pH (pH); cor das colônias (COR); tamanho das colônias, puntiformes ou medidas em mm (TAM); tipo de borda (TB); quantidade de muco produzida (QM); aparência das colônias (AP); elasticidade do muco (ELAS); forma das colônias (FOR) e transparência das colônias (TRANS), considerando todos os isolados.

Esses dados corroboram os resultados de Santos et al. (2007) que obtiveram um total de 433 isolados de rizóbio, por meio de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, em que cerca de 90% dos isolados formaram colônias em até dois dias de crescimento, caracterizando estirpes de crescimento rápido. De modo geral, os isolados que apresentavam crescimento em apenas um dia, com reação ácida em meio de cultura, foram os obtidos dos solos do sertão, sugerindo maior capacidade de adaptação a essas condições. Dentre os grupos de rizóbio que nodulam essas leguminosas, existem grupos significativos de isolados diferentes dos que têm sido definidos como *Bradyrhizobium* spp.

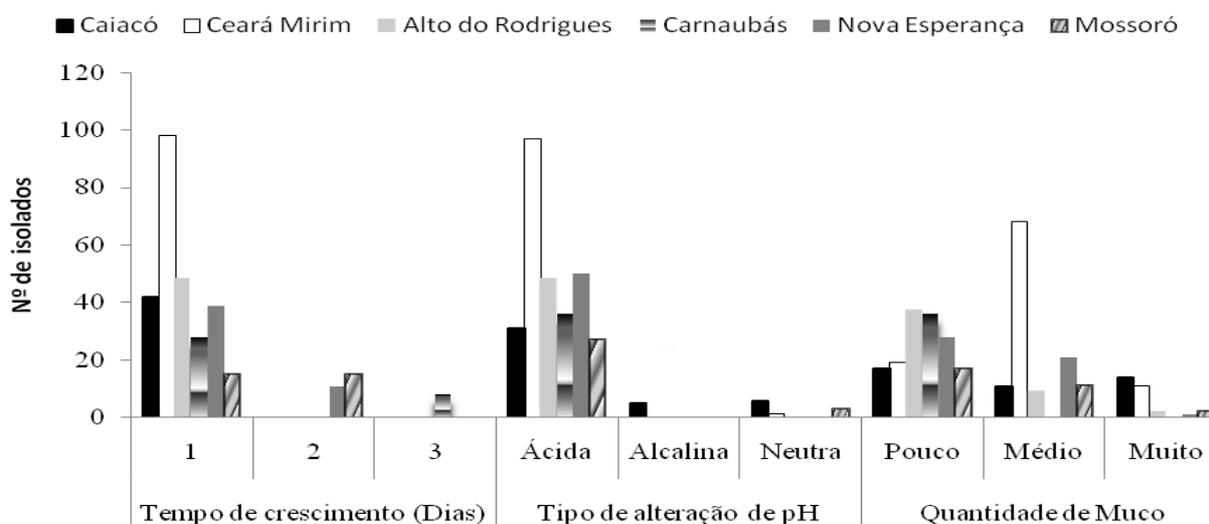
A maior parte dos estudos desenvolvidos até o momento mostra que o grupo de rizóbio que nodula caupi apresenta crescimento lento, característica do gênero *Bradyrhizobium* (SALEENA et al., 2001; ZILLI et al., 2004; 2006). Entretanto, alguns trabalhos já evidenciaram que rizóbios de crescimento rápido também são capazes de induzir nódulos em caupi (ZHANG et al., 2007). Os rizóbios de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas. Esta característica constitui uma estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca do que os de crescimento lento e se multiplicam rapidamente em curto espaço de tempo úmido, o que explicaria sua maior frequência nos solos das regiões semi-áridas (SANTOS et al., 2007). Xavier et al. (1998), em estudos com isolados de caupi de solos da região semi-árida do Estado de Pernambuco, observaram que o padrão de resistência à alta temperatura, salinidade e antibióticos, características que têm sido relacionadas à maior competitividade, não pode ser relacionado com

qualquer característica de crescimento.

Em estudos nos quais se avaliou a diversidade morfológica de isolados de rizóbio utilizando espécies filogeneticamente diferentes, como plantas hospedeiras, entre estas *Arachis hypogaea* em amostras de solos da região semiárida do Nordeste brasileiro, foi observada predominância de isolados com crescimento rápido (SANTOS et al., 2007). Figueiredo et al. (1996) isolaram rizóbio de caupi, soja e jacatupé, em amostras de solo da Zona da Mata e da região semiárida de Pernambuco, e constataram que 90% dos isolados da região semiárida apresentaram crescimento rápido, enquanto 100% dos isolados da Zona da Mata apresentaram crescimento lento.

Considerando a distribuição de isolados por local de coleta dos solos para isolamento, pode-se observar similaridade entre a diversidade de isolados apresentada nos diferentes locais de coleta, uma vez que a maior parte dos isolados de cada local apresentou crescimento em um dia, com tendência de acidificar o pH do meio de cultivo. Foi observada maior variação para a quantidade de muco produzido (Figura 2).

Resultados do estudo realizado por Figueiredo et al. (1996) mostraram que a ocorrência de rizóbio de crescimento lento ou rápido parece estar relacionada com aspectos ambientais. Esses autores isolaram rizóbios de caupi, soja e jacatupé em amostras de solos da Zona da Mata e da região semiárida de Pernambuco. Como os isolados do presente estudo foram isolados de solos do Estado do Rio Grande do Norte, que apresenta clima semi-árido, os resultados corroboram as observações prévias, uma vez que nesta coleção estão presentes isolados de crescimento rápido ou muito rápido.

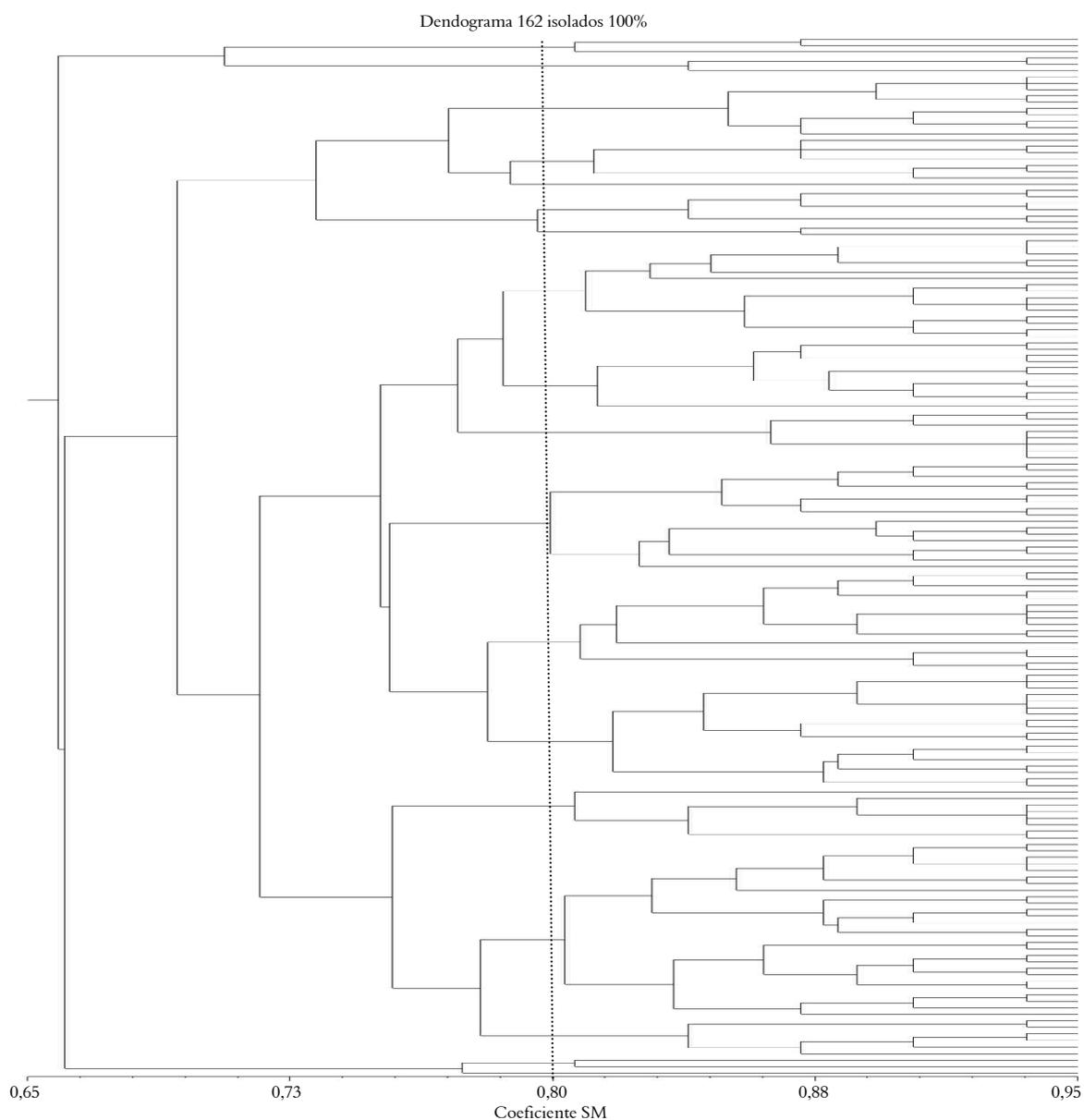


**Figura 2.** Distribuição dos isolados de rizóbio obtidos de nódulos radiculares de feijão-caupi, quanto às características morfológicas de tempo de crescimento em dias (TC), alteração de pH (pH) e quantidade de muco produzida (QM) considerando a distribuição por local de coleta do solo.

Neste estudo, não foram obtidos isolados de colônias secas; todos os isolados obtidos apresentam produção de muco, embora a maioria apresente pouco muco. Coutinho et al. (1999) sugeriram que a produção de muco representaria um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência do rizóbio em condições adversas de solo e clima. A produção de muco altera a permeabilidade das células, tornando as estirpes mais resistentes a fatores bióticos de competição no solo, como a presença de microrganismos produtores de antibióticos. Batista et al. (2007) observaram tendência de incremento na produção de muco por isolados de *Bradyrhizobium*, como reflexo da adaptação a condições de solos

ácidos do Cerrado brasileiro.

Com os dados da caracterização morfológica, foi elaborado um dendrograma de similaridade entre os isolados. Para tanto, inicialmente eles foram classificados de acordo com as características morfológicas, e foram eliminados da análise os isolados com 100% de similaridade, utilizando apenas um para construção do agrupamento. Isso permitiu a eliminação de múltiplas bifurcações na árvore. Os 304 isolados distribuíram-se em 162 perfis morfológicos distintos, e estes foram agrupados em 18 grupos em nível de 80% de similaridade, evidenciando elevada diversidade morfológica (Figura 3).



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade construído com o índice de SM e algoritmo UPGMA dos isolados representativos dos perfis morfológicos, evidenciando os agrupamentos formados.

Fernandes et al. (2003a e b), ao caracterizar estirpes nativas dos tabuleiros costeiros de Sergipe com alta eficiência de fixação biológica em nitrogênio, observaram alta diversidade entre os isolados, uma vez que foram identificadas estirpes com similaridade tanto a *Bradyrhizobium* quanto a *Rhizobium*. Os autores concluíram, ainda, que é possível selecionar estirpes nativas eficientes para as espécies estudadas. Em outro ambiente de coleta, elevada diversidade morfológica e de padrões protéicos entre isolados de caupi também foi observada por Soares et al. (2006). Os autores observaram pelos perfis protéicos totais que a maioria dos isolados, a 80% de similaridade, foi classificada com *Sinorhizobium meliloti*.

Melloni et al. (2006), avaliando a diversidade de isolados de caupi e feijão comum em áreas reabilitadas após mineração de bauxita, observaram que o caupi é mais indicado que o feijão para estudos de nodulação, eficiência e diversidade fenotípica, por recuperar maior diversidade de isolados de rizóbio. Neste estudo, 420 isolados de caupi foram agrupados em 24 grupos morfológicos, e 70% (293) apresentaram similaridade com *Bradyrhizobium*, os demais isolados apresentaram similaridade com diversos outros gêneros.

Zhang et al. (2007) obtiveram isolados de caupi de diferentes regiões da China e observaram, na coleção, por análises moleculares do gene ribossomal 16S, isolados com similaridade a *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Os autores identificaram, ainda, isolados com similaridade a *Bradyrhizobium*, mas que diferiram das espécies atualmente descritas no gênero, sinalizando para a possibilidade de pertencerem a uma espécie ainda não caracterizada. Os resultados apresentados, tanto os da literatura quanto os do presente trabalho, demonstram a baixa especificidade do feijão-caupi com relação ao microssimbionte para estabelecer a nodulação e apontam a espécie como uma boa opção como planta-isca. Em relação à seleção de estirpes eficientes para inoculação, estas, além de eficientes no processo de conversão de nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados, deverão apresentar competitividade frente aos rizóbios nativos, uma vez que a espécie é promíscua. Nesse sentido, torna-se de suma importância a busca de isolados da região onde se deseja cultivar o caupi, a fim de selecionar os isolados adaptados às condições ambientais, que invariavelmente são adversas, sejam por questões de temperatura do solo, baixa fertilidade ou salinidade.

## Conclusão

Os isolados obtidos apresentaram crescimento rápido e ácido em meio de cultivo.

Os resultados indicam elevada diversidade morfológica da população nativa de rizóbio do semi-árido do Rio Grande do Norte.

Não foi observada diferença de diversidade de isolados de rizóbio entre as diferentes amostras de solo analisadas.

## Referências

- BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrado soil. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 2, p. 270-284, 2007.
- BORGES, W. L.; SANTOS, C. E. R. S.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de acessos de amendoim com estirpes nativas de rizóbios. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 1, p. 32-37, 2007.
- CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMOES-ARAUJO, J. L.; CHOU, J. F.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005.
- COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; LOVATO, A.; MAIA, A. H. N.; MANFIO, G. P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 2, p. 159-167, 1999.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Selection of indigenous rhizobia to the cowpea, pigeonpea and jackbean crops in the coastal tableland of Sergipe, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003a.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of indigenous rhizobia strains from the coastal tableland efficient for the pigeonpea and cowpea crops. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 911-920, 2003b.
- FERREIRA, N. A.; ARF, O.; CARVALHO, M. A. C.; ARAÚJO, R. S.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 507-512, 2000.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; MEDEIROS, R.; SANTOS, C. E. R. S. Efeito da adubação com diferentes relações potássio/magnésio no jacatupé em latossolo amarelo com e sem inoculação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 20, n. 1, p. 49-54, 1996.
- FRANCO, E.; ANDRADE, C. A. B.; SCAPIM, C. A.;

- FREITAS, S. L. Resposta do feijoeiro à aplicação de Nitrogênio na semeadura e cobertura no sistema de plantio direto. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 427-434, 2008.
- FREIRE FILHO, F. R. Melhoramento Genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Avanços tecnológicos feijão-caupi**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2005. p. 29-75.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 151-164, 2000.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Dordrecht: Amsterdam: Springer, 2005. p. 25-42.
- JESUS, E. D. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Leguminosae nodulating bacteria diversity from three different land use systems in Brazilian Western Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. 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.
- MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. D.; NOBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Efficiency and phenotypic diversity among nitrogen-fixing bacteria that nodulate cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in bauxite-mined soils under rehabilitation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 948-950, 2001.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: State University of New York, 1994.
- SALEENA, L. M.; LOGANATHAN, P.; RANGARAJAN, S.; NAIR, S. Genetic diversity and relationship between *Bradyrhizobium* strains isolated from blackgram and cowpea. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, n. 4, p. 276-281, 2001.
- SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S. F.; VIEIRA, I. M. M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N<sub>2</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 2, p. 301-307, 2005.
- SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.
- SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). I – caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 386-392, 1998.
- ZHANG, W. T.; YANG, J. K.; YUAN, T. Y.; ZHOU, J. C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 1, p. 201-210, 2007.
- ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 281-287, 2004.
- ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE, F. R.; NEVES, M. C. P. Symbiotic efficiency of cowpea *Bradyrhizobium* strains in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

Received on January 31, 2008.

Accepted on May 2, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.