



**UEPB**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**GILMAR SILVA OLIVEIRA**

**INFLUÊNCIA DO BIOCHAR NA INTERAÇÃO RIZÓBIO FEIJÃO-CAUPI EM  
DOIS SOLOS DO SERTÃO DO SÃO FRANCISCO**

**CAMPINA GRANDE – PB  
2018**

**GILMAR SILVA OLIVEIRA**

**INFLUÊNCIA DO BIOCHAR NA INTERAÇÃO RIZÓBIO FEIJÃO-CAUPI EM  
DOIS TIPOS DE SOLOS DO SERTÃO DO SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, nível mestrado da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

**Área de Concentração:** Agricultura Familiar e Sustentabilidade.

**Orientador:** D.Sc. Paulo Ivan Fernandes Júnior

**Campina Grande – PB  
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

O48i Oliveira, Gilmar Silva.  
Influência do biochar na interação rizóbio feijão-caupi em dois tipos de solos do sertão do São Francisco [manuscrito] / Gilmar Silva Oliveira. - 2018.  
77 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2018.  
"Orientação : Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior, Coordenação do Curso de Ciências Agrárias - CCHA."  
1. Cultivo de feijão. 2. Vigna unguiculata L. 3. Eficiência nodular. I. Título  
21. ed. CDD 633.372

**GILMAR SILVA OLIVEIRA**

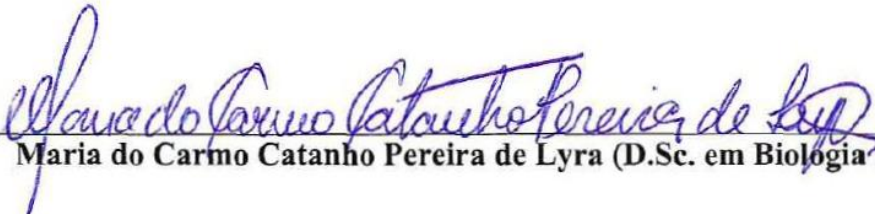
**INFLUÊNCIA DO BIOCHAR NA INTERAÇÃO RIZÓBIO FEIJÃO-CAUPI EM  
DOIS TIPOS DE SOLOS DO SERTÃO DO SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias nível mestrado da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

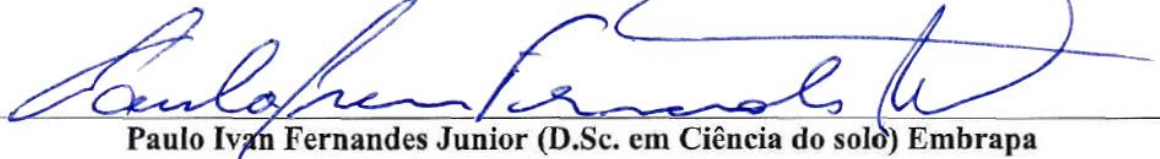
**Área de Concentração:** Agricultura Familiar e Sustentabilidade

**Aprovado em: 05 de Julho de 2018**

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra (D.Sc. em Biologia Molecular) – IPA

  
\_\_\_\_\_  
Yuri Lima Melo (D.Sc. em Fitotecnia) – DNPD-CAPE/UEPB

  
\_\_\_\_\_  
Paulo Ivan Fernandes Junior (D.Sc. em Ciência do solo) Embrapa  
Semiárido–Orientador

*À minha família, em especial meus pais, Maria  
das Graças e Cícero por todo o incentivo para  
realização dos meus sonhos.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, como já dizia Ariano Suassuna, “eu não conseguiria conviver com essa visão amarga, dura, atormentada e sangrenta do mundo, ou existe Deus ou a vida não tem sentido algum, bastaria a morte pra tirar qualquer sentido da existência”.

A meus pais, por saberem o valor que tem o conhecimento e por lutarem incansavelmente para permitir que seus filhos tivessem o estudo que tanto sonharam pra si, mas que a árdua luta pela sobrevivência os subtraiu.

A minha tia Cleonice e seu esposo João Pedro, assim como meus primos Ruan e Ricardo, por me permitirem adentrar seu lar e por terem me acolhido com tanta generosidade e carinho.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior, não só pela confiança na execução desse projeto, mas também, por ter se mostrado um exemplo de educador e profissional. Seus ensinamentos e paciência trouxeram pra mim a disciplina e conduta que espero em qualquer ambiente de trabalho.

À Dra. Diana Signor, por toda ajuda, paciência e boa vontade durante a execução desse projeto, e por ter se mostrado um exemplo de mulher e profissional. Deus tem colocado muitas almas bondosas em minha vida, e Dra. Diana, por trás de toda sua generosidade foi o maior exemplo disso.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia do solo, incluindo, Luiz Antônio, Thayse Rosa, João, Beatriz, Reginaldo Neto, Lucas, Valéria, Claudia, Viviane, Jéssiaca, Paula, Thailane, Rejane, Aleksandro e Pâmela, cada um teve sua importância, e só tenho a agradecer os momentos de alegria e coleguismo.

Às estagiárias Thamara e Bianca, por estarem presentes durante toda execução desse projeto, e minha amiga Juliana Ribeiro, sempre conosco, com sua incansável ajuda e interminável alegria.

À Dona Shirley Amaral, que de ante de uma situação difícil, estendeu-me a mão e me apresentou ao lar onde fui verdadeiramente feliz.

À minha amiga Jeise, por toda ajuda e pelos momentos de descontração e alegria.

Ao meu amigo Erivelton Santos, que destinou cada segundo do seu estágio para aprender algo novo, e que além do estágio, ganhou um amigo pra vida toda.

À todas as Marias que passaram e permanecem na minha vida, em especial, Maria de Lourdes e Maria Queiroz, pela amizade, incentivo, companhia e ensinamento. Um pouco do que sou é resultado do muito que vocês me mostraram.

Ao Dr. Aristoclático Rodrigues Soares, o companheiro que Deus me deu, um amigo e apoiador para todo e qualquer momento da minha vida.

A UEPB e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias (PPGCA), pela confiança em minha pessoa, e por dar-me a oportunidade de concluir uma pós-graduação.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

A Embrapa semiárido, pela estrutura, assim como os serviços prestados para realização dessa pesquisa.

Enfim, a toda sociedade brasileira, em particular o pequeno agricultor. Embora muitos não compreendam e nem ao menos sonhem que pesquisas como essa são desenvolvidas em nosso país, é justamente com seus tributos que trabalhos como esse podem sair do papel.

A todos vocês, meu muito obrigado!

*Sei o que devo ser e ainda não sou, mas rendo graças  
a Deus por estar trabalhando, embora lentamente, por  
dentro de mim próprio, para chegar, um dia, a ser o  
que devo ser.*

***Chico Xavier***



## RESUMO

O feijão-caupi é uma das leguminosas mais adaptadas, e nutritivas entre as espécies de feijão cultivadas. A baixa seletividade rizobiana por parte dessa cultura, faz com que seja necessária a seleção de bactérias fixadoras, que apresentem boa eficiência simbiótica. O uso de biomassa pirolisada, conhecida como Biochar, tem surgido como um condicionador de solos eficiente. Sua aplicação ao solo tem sido empregada como um valioso método de sequestro de carbono, diminuindo além das emissões de CO<sub>2</sub>, outros compostos com o CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O. Esse trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de biochar e da inoculação sobre o desenvolvimento do feijão-caupi e emissão de GEE nesse tipo de cultivo, como também, observar a diversidade genética e eficiência de parâmetros agrônômicos dos isolados bacterianos capturados em diferentes solos do Vale do São Francisco. Foi montado um experimento em vasos utilizando um Vertissolo proveniente da Estação Experimental de Mandacarú na Bahia e um Argissolo da Estação Experimental de Bebedouro em Pernambuco, ambas pertencentes a Embrapa Semiárido, o experimento seguiu um esquema fatorial de 2 x 2 x 4, sendo dois solos, duas aplicações de biochar (presença ou ausência) em uma dosagem de 15 g/kg solo<sup>-1</sup> e quatro tratamentos nitrogenados, sendo eles; dois inoculantes, um comercial (BR 3267) e um ainda em fase de testes pela Embrapa Semiárido (ESA 17), uma aplicação de N mineral em uma dosagem de 80 kg/ha<sup>-1</sup> e um controle absoluto. Foi também medido, os fluxos de GEEs (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O) obedecendo os tratamentos. Além disso, foram isolados 79 bactérias do feijão-caupi para os dois solos, os isolados tiveram seu DNA extraído e através das técnicas de IGS-RFLP e BOX-PCR e um posterior sequenciamento, foram classificadas comparando-se as sequências geradas com as disponíveis no GenBank. 30 isolados selecionados tiveram sua eficiência simbiótica comparadas. Para o experimento testando os efeitos do biochar sobre o desenvolvimento do caupi com os quatro inoculantes e as emissões de GEE, foi constatado alterações no NN e MNS, assim como uma leve diferença visual dos números para massa da MPAS, indicando efeitos significativos do biochar sobre o desenvolvimento feijão-caupi nos dois solos. As maiores emissões de CO<sub>2</sub> e redução de CH<sub>4</sub> foi observada nos Vertissolos. Enquanto que as menores emissões de N<sub>2</sub>O foi observada no Argissolo. O agrupamento dos isolados de rizóbios reveladas pela análise de restrição do IGS e *fingerprinting* do BOX-PCR, por solos, sugerem que a aplicação de biochar não teve influência sobre as comunidades de rizóbios. Ao todo, foram identificadas 6 espécies de rizóbio divididas em dois gêneros, capazes de nodular o caupi, o surgimento da *Microvirga ossetica* indica uma alta variabilidade genética de rizóbios nos solos do Vale do São Francisco e sua baixa similaridade com as espécies do mesmo gênero indica que pode se tratar de uma espécie ainda não descrita. Os isolados submetidos ao teste de eficiência se mostraram diferentes estatisticamente, apresentando bons resultados para MPAS, NN, NTOT e EN, equiparando-se em alguns casos a referência e a testemunha nitrogenada.

**Palavras chave:** *Bradyrhizobium*, *Vigna unguiculata* L., Dióxido de carbono, Eficiência nodular, Diazotróficas.

## ABSTRACT

Cowpea is one of the most adapted and nutritious legumes among cultivated bean species. The low rhizobial selectivity on the part of this culture, makes necessary the selection of fixing bacteria, which present good symbiotic efficiency. The use of pyrolysed biomass, known as Biochar, has emerged as an efficient soil conditioner. Its application to the soil has been used as a valuable method of carbon sequestration, decreasing beyond CO<sub>2</sub> emissions, other compounds with CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O. This work aimed to evaluate the effect of biochar application and inoculation on the development of cowpea and GHG emission in this type of crop, as well as to observe the genetic diversity and efficiency of agronomic parameters of the bacterial isolates captured in different soils of the Valley of San Francisco. An experiment was carried out in pots using a Vertisol from the Mandacará Experimental Station in Bahia and an Argissolo from the Experimental Station of Bebedouro in Pernambuco, both belonging to Embrapa Semiárid, the experiment followed a factorial scheme of 2 x 2 x 4, two solos, two applications of biochar (presence or absence) in a dosage of 15 g / kg soil<sup>-1</sup> and four nitrogen treatments, being them; two inoculants, one commercial (BR 3267) and one still in the test phase by Embrapa Semiárid (ESA 17), an application of mineral N at a dosage of 80 kg / ha<sup>-1</sup> and an absolute control. It was also measured the GHG fluxes (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O) obeying the treatments. In addition, 79 cowpea bacteria were isolated for the two soils, the isolates had their DNA extracted and through the IGS-RFLP and BOX-PCR techniques and a subsequent sequencing were classified by comparing the sequences generated with those available on GenBank. 30 selected isolates had their symbiotic efficiency compared. For the experiment testing the effects of biochar on the development of cowpea with the four inoculants and GHG emissions, it was observed changes in NN and MNS, as well as a slight visual difference of the numbers for MPAS mass, indicating significant effects of biochar on the development of cowpea in the two soils. The highest CO<sub>2</sub> emissions and CH<sub>4</sub> reduction were observed in the Vertisols. While the lowest emissions of N<sub>2</sub>O was observed in the Argisol. The clustering of the rhizobia isolates revealed by the restriction analysis of IGS and *fingerprinting* of BOX-PCR, by soils, suggest that the application of biochar had no influence on the rhizobia communities. In all, 6 rhizobia species were identified, divided into two genera, able to nodulate the cowpea. The emergence of microviruses indicates a high genetic variability of rhizobia in the soils of the São Francisco Valley and their low similarity with species of the same genus indicates which may be a species not yet described. The isolates submitted to the efficiency test were statistically different, presenting good results for MPAS, NN, NTOT and EN, in some cases being the reference and the nitrogen control.

**Key words:** *Bradyrhizobium*, *Vigna unguiculata* L., Carbon dioxide, Nodular efficiency, Diazotrophic.

## LISTA DE TABELAS

Pag

<b>Tabela 1:</b> Resultados das análises físicas dos solos utilizados no experimento Argissolo (ARS) e Vertissolo (VRS). .....	25
<b>Tabela 2:</b> Resultados das análises químicas dos solos das comunidades Bebedouro e Mandacarú. Argissolo (ARS) e Vertissolo (VRS). .....	25
<b>Tabela 3:</b> Número e massa de nódulos secos de plantas de feijão-caupi produzidas em dois solos (ARS = Argissolo e VRS = Vertissolo) do Vale do São Francisco presença (+ biochar) e ausência (- biochar) aplicação de <i>biochar</i> . .....	35
<b>Tabela 4:</b> Massas da parte aérea e radiculares secas de plantas de feijão-caupi produzidas em dois solos (ARS = Argissolo e VRS = Vertissolo) do Vale do São Francisco presença (+ biochar) e ausência (- biochar) aplicação de <i>biochar</i> . .....	37
<b>Tabela 5:</b> Teores de Nitrogênio foliar de plantas de feijão-caupi produzidas nos dois solos (Vertissolo e Argissolo) do Vale dos São Francisco presença e ausência aplicação de biochar. .....	40
<b>Tabela 6.</b> Comparação dos fluxos de CO <sub>2</sub> entre coletas .....	41
<b>Tabela 7.</b> Emissões totais acumuladas ao longo do experimento. ....	42
<b>Tabela 8:</b> Resultados das análises químicas dos solos dos campos experimentais de Bebedouro (Argissolo) e Mandacarú (Vertissolo). .....	43
<b>Tabela 9:</b> Resultados das análises físicas dos solos dos campos experimentais de Bebedouro (Argissolo) e Mandacarú (Vertissolo). .....	44
<b>Tabela 10:</b> relação de bactérias obtidas em cada solo na presença e ausência da aplicação do biochar. ....	44
<b>Tabela 11.</b> Identificação dos isolados bacterianos de ( <i>Vigna unguiculata</i> ) dos dois solos (Vertissolo e Argissolo) “presença” e “ausência” a aplicação de biochar por meio da comparação das sequências parciais do espaço intergênico-IGS com as disponibilizadas pelo GenBank. ....	56
<b>Tabela 12:</b> produção de massa da parte aérea seca (MPAS), massa da raiz seca (MRS), Massa de nódulos secos (MNS), Número de nódulos (NN), Nitrogênio total na parte aérea (NTOT) e Eficiência nodular (E.N.). ....	62

## LISTA DE FIGURAS

	Pag
<b>Figura 1:</b> Localização da Embrapa Semiárido (imagem Google Earth 2017). .....	26
<b>Figura 2:</b> Localização dos pontos de coleta dos dois solos: (ARS) proveniente da estação experimental de Bebedouro e (VRS) originário da estação experimental de Mandacaré, ambos localizados no Vale do São Francisco. ....	37
<b>Figura 3:</b> (A) Distribuição dos tratamentos em campo, (C) Bases das câmaras fixadas ao solo, (B) Câmara com todos os componentes e pronta para coleta dos GEE. ....	30
<b>Figura 4:</b> (A) Componentes para construção da câmara de coleta de GEE, (B) câmara pronta para uso, com altura total após fixada no solo. ....	31
<b>Figura 5:</b> Fluxos de (A) CO <sub>2</sub> , (B) CH <sub>4</sub> e (C) N <sub>2</sub> O no cultivo de feijão-caupi em função da aplicação de biocarvão e de diferentes fontes de N em Argissolo e Vertissolo. Erro-padrão da média (n=4). ....	42
<b>Figura 6.</b> Amplificação do espaço intergênico-IGS (16S-23S rRNA) de algumas das 72 bactérias representativas M = Marcador molecular (100 pb). ....	47
<b>Figura 7.</b> Digestão dos produtos de amplificação do espaço intergênico-IGS (16S-23S rRNA) de 23 isolados utilizando as endonucleases <i>Alu I</i> , <i>Hind III</i> e <i>Hin 6I</i> . M = Marcador molecular (100 pb). ....	48
<b>Figura 8.</b> Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS-RFLP digerido com as enzimas <i>Hin 6I</i> , <i>Hind III</i> e <i>Alu I</i> de isolados de feijão-caupi [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], obtidos de dois solos (Vertissolo e Argissolo) ambos do Vale do São Francisco. <b>Obs: CC=Com biochar e SC=Sem biochar.</b> ...	50
<b>Figura 9.</b> BOX-PCR de alguns dos isolados que apresentaram 100% de similaridade no IGS-RFLP. ....	54
<b>Figura 10.</b> Perfis de DNA obtidos para os 48, após a amplificação utilizando o primer BOX-A1. Os perfis obtidos foram analisados utilizando o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Dice a 2%. ....	56
<b>Figura 11.</b> Árvore filogenética com base nas sequências IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados bacterianos do feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbour-Joining Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados. ....	61
<b>Figura 12.</b> Árvore filogenética com base nas sequências IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados bacterianos do feijão-caupi .Agrupamento utilizado Neighbour-Joining Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados.....	62
<b>Figura 13.</b> Eficiência nodular de 29 isolados bacterianos de nódulos de feijão-caupi cultivado em dois solos do vale do São Francisco + estirpe referência BR 3267. (Scot-Knott; 5%). Média de 4 repetições. ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

**IGS** - *Intergenic Sequences*

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction*

**RFLP** - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**GEE** – Gases de efeito estufa

**FBN** – Fixação Biológica de Nitrogênio

**BFN** – Bactéria Fixadora de Nitrogênio

**VRS** – Vertissolo

**ARS** – Argissolo

**YMA** – Yeast Manitol Agar

**ADE** – Água Destilada e Autoclavada

**DAP** – Dias Após Plantio

**N<sub>2</sub>O** – Óxido Nitroso

**CH<sub>4</sub>** – Metano

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**NN** – Número de Nódulos

**MNS** – Massa de Nódulos Secos

**NTOT** – Nitrogênio Total

**EN** – Eficiência Nodular

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1. GERAL .....	16
2.2. ESPECÍFICOS .....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
3.1. FEIJÃO-CAUPI: DADOS DE PRODUÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....	17
3.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) .....	19
3.3. EMISSÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA (GEE) NA AGRICULTURA .....	20
3.4. BIOCHAR: USO DE BIOMASSA PIROLISADA NA AGRICULTURA .....	22
3.5. CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIO POR MEIO DE FERRAMENTAS MOLECULARES .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	26
4.2. INSTALAÇÃO, COLETA E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
4.3. PLANEJAMENTO E CONFECÇÃO DAS CÂMARAS E COLETA DOS GEE.....	29
4.4. COLETA DOS GASES.....	31
4.5. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS .....	32
4.6. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	32
4.7. PCR E AMPLIFICAÇÃO DE ESPAÇO INTERGÊNICO - IGS.....	33
4.8. REAÇÕES DE RESTRIÇÃO E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS.....	33
4.9. <i>FINGERPRINTING</i> MOLECULAR POR MEIO DA TÉCNICA DE BOX-PCR.....	34
4.10. SEQUENCIAMENTO DO ESPAÇO INTERGÊNICO IGS.....	34
4.11. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DOS ISOLADOS .....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. EFEITO DO BIOCHAR SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO FEIJÃO-CAUPI .....	37
5.2. EMISSÕES DE GEEs (CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O E CH <sub>4</sub> ) EM VASOS .....	42
5.3. ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO APÓS PLANTIO DE FEIJÃO-CAUPI INOCULADO.....	45
5.4. EXPERIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS .....	47
5.5. IGS-RFLP COMO FERRAMENTA PRELIMINAR PARA SELEÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	48

5.6. <i>FINGERPRINTING</i> PARA SEPARAÇÃO INTRAESPECÍFICA DOS ISOLADOS IGS-RFLP POR BOX-PCR .....	54
5.7. EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS DE FEIJÃO-CAUPI OBTIDOS DE DOIS SOLOS DO VALE DO SÃO FRANCISCO. ....	64
6. CONCLUSÃO .....	68
7. REFERÊNCIAS .....	69

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das leguminosas mais adaptadas, versáteis e nutritivas entre as espécies de feijão cultivadas, sendo um importante alimento e um componente essencial nos sistemas de produção das regiões secas dos trópicos (SINGH et al., 2002; MATOS-FILHO et al., 2009). No Brasil, a maior produção desse grão se concentra na Região Norte, tendo em vista sua boa adaptação. Entretanto, a escassez de água e as altas temperaturas na região do semiárido, bem como os poucos recursos tecnológicos disponíveis para o uso em sistema de cultivo de feijão-caupi, são os principais responsáveis pela baixa produtividade na região (FERNANDES-JUNIOR & REIS, 2008; FERNANDES-JUNIOR et al., 2012; MARINHO et al., 2014).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN), resultante da interação simbiótica da planta (leguminosa), com as bactérias fixadoras de nitrogênio, vulgarmente denominadas de rizóbio, pode atingir altos níveis de produtividade, em alguns casos, chegando até 40% ou 90% do total de N acumulado pela cultura (FRANCO et al., 2002). A relação simbiótica entre plantas e rizóbio se dá pela conversão do nitrogênio em sua forma molecular ( $N_2$ ), abundantemente presente na atmosfera, em amônia ( $NH_3$ ).

O feijão-caupi apresenta uma alta promiscuidade quanto a nodulação com FBN (TAMPAKAKI et al., 2017), essa baixa seletividade por parte das plantas faz com que, tratando-se de fixação de N, ocorra uma diminuição da eficiência do N fixado devido a competição com bactérias que mais induzem a nodulação do que a fixação do N (XAVIER et al., 2006). Com isso, faz-se necessário a seleção de estirpes que melhor possam ser exploradas, proporcionando ao mercado uma seleção de inoculantes à base de bactérias altamente eficientes (MARINHO et al., 2017).

A descoberta da PCR revolucionou os métodos para o estudo de diversidade. A técnica consiste na hibridização de sequências gênicas específicas utilizando *primers* e outros compostos em ciclos que envolvem altas temperaturas para desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* ou iniciadores e extensão das sequências que se deseja amplificar (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999). Ferramentas moleculares como polimorfismo de sequências intergênicas (*Intergenic Sequences* – IGS) e, polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* – PCR-RFLP), vem sendo eficientes nos estudos de diversidade



(DOIGNON-BOURCIER et al., 2000; FAZAELI et al., 2000; WEI et al., 2003; JAISWAL et al., 2017; TAMPAKAKI et al., 2017).

Interferindo de forma extremamente equilibrada dentro do ciclo do nitrogênio, a FBN infere principalmente sobre as emissões de GEE (Gases de Efeito Estufa), o que vem mobilizando diversos países na procura por estratégias para redução das emissões desses gases. O uso de biomassa pirolisada, conhecida também como Biochar, surge como uma das alternativas para o sequestro de carbono no solo, porém, já se sabe que o biochar também tem influência sobre outros compostos gasosos liberados pelo solo com o CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O (LEHMANN et al., 2011, CAYUELA et al., 2013).

Quando se fala de condicionador de solos, o Biochar pode se comportar diferentemente dependendo de que material ele foi originado, quando produzido a partir de *Eucalyptus sp.*, por exemplo, o biochar apresenta características físicas bastante significativas, possuindo alta área de superfície específica, devido a sua porosidade (SANTOS et al., 2011). Mediante estas características, esse material pode afetar as propriedades físico-químicas e conseqüentemente hídricas do solo e serve como habitat para os micro-organismos, daí seu potencial como condicionador do solo (SANTOS et al., 2011).

O interesse pelos efeitos do biochar sobre a comunidade microbiana do solo, bem como, sua influência sobre bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio e do metano vem sendo recorrente (WARNOCK et al., 2007; LEHMANN et al., 2011, ABUJABHAH et al., 2017). Ainda existe uma escassez de estudos para elucidar essa vasta gama de perguntas a cerca de um sistema tão complexo como a fração biológica do solo, mas já se sabe que o uso do biochar tem efeito positivo sobre as frações física e química do solo, o que conseqüentemente afeta a atividade microbiana (ABUJABHAH et al., 2016; ABUJABHAH et al., 2017). Assim, lançando-se mão da vasta gama de recursos e técnicas atualmente conhecidos para seleção de isolados bacterianos associativos e simbióticos, associado ao uso de compostos físicos para modificação das características físico-químicas e conseqüentemente a biota do solo, se faz necessário a realização de mais estudos que possa apontar como essas técnicas juntas podem ser benéficas para maiores produções agrícolas com menos impactos sobre o meio ambiente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Avaliar o efeito do biochar e da inoculação sobre o desenvolvimento do feijão-caupi, quantificar a emissão dos Gases de Efeito Estufa (GEE) nesse tipo de cultivo, além de estudar a diversidade genética e a eficiência agrônômica dos isolados capturados em diferentes solos do Vale do São Francisco.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Estimar o efeito da inoculação e da aplicação de biochar sobre o desenvolvimento do feijão-caupi cultivado em diferentes solos do vale do São Francisco.
- Avaliar os efeitos da aplicação de nitrogênio mineral sobre a fixação biológica de nitrogênio em diferentes solos do vale do São Francisco.
- Avaliar os efeitos da aplicação carvão vegetal e inoculantes sobre a emissão dos GEE do solo em cultivo de feijão-caupi em diferentes solos do Vale do São Francisco.
- Determinar a diversidade genética de bactérias fixadoras de nitrogênio em diferentes solos do Vale do São Francisco.
- Avaliar a eficiência agrônômica das bactérias isoladas dos solos do vale do São Francisco.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. FEIJÃO-CAUPI: DADOS DE PRODUÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das leguminosas mais adaptadas, versáteis e nutritivas entre as espécies de feijão cultivadas, sendo um importante alimento e um componente essencial nos sistemas de produção das regiões secas dos trópicos, que cobrem parte da Ásia, Estados Unidos, Oriente Médio e Américas Central e do Sul (SINGH et al., 2002; MATOS-FILHO et al., 2009). É uma cultura de origem Africana, introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses, ainda no século XIV, sua entrada, se deu inicialmente pelo estado da Bahia, sendo disseminado pelo restante do país (FREIRE-FILHO et al., 2011).

O caupi possui uma vasta gama de denominações de acordo com a região do país onde é produzido, ou mesmo, apenas consumido. Os nomes mais comuns são: feijão-de-corda e macassar ou macaçar (Nordeste), feijão de praia e de estrada (Norte), feijão miúdo (Sul), catador e geruba (Bahia e Norte de Minas), feijão-fradinho (Rio de Janeiro) e ainda, feijão-caupi, feijão-pardo, feijão-verde, feijão-manteiga e ervilha-de-vaca, entre outros (ARAÚJO et al., 1984; SPIAGGIA, 2003). A produção mundial de feijão, incluindo o feijão-comum e o feijão-caupi, aumentou 59,1% no período compreendido entre 1961 e 2005 BOVESPA (2012). Os cinco maiores produtores mundiais desse grão são: Nigéria (2,5 milhões de toneladas), Níger (906 mil toneladas), Burkina Faso (398 mil toneladas), Tanzânia (137 mil toneladas) e Mianmar (131 mil toneladas) (FAO, 2016).

No Brasil, o cultivo do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) predomina nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, possivelmente em razão de fatores de ordem climática. Já o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] predomina nas regiões Nordeste e Norte. Porém, por ser uma espécie adaptada às condições tropicais e subtropicais, produz bem em todas as regiões do País (SINGH, 2006; FREIRE-FILHO, 2011).

Os grãos dessa leguminosa podem ser comercializados verdes ou secos, e até mesmo, ainda no estágio de vagens, utilizadas para elaboração de saladas, o comércio do feijão verde, como é chamado o caupi ainda no estágio de maturação, possui um cunho mais artesanal/manual acontecendo principalmente em torno dos grandes centros urbanos, trabalho esse restrito principalmente à agricultura familiar (FREIRE-FILHO et al., 2011), Zilli et al., (2009), ressalta em seu estudo sobre o feijão-caupi na Amazônia, que essa

cultura ocupa lugar de destaque em termos de produção e consumo no Brasil, e que em particular seu expressivo consumo está vinculado às tradições culinárias das regiões Norte e Nordeste do país, e que o sistema de produção ainda é típico da agricultura familiar. Uma das características mais importantes do feijão-caupi é seu curto período de cultivo, girando em torno de 80 dias, com uma produção média estimada de  $317 \text{ kg/ha}^{-1}$  (ZILLI et al., 2009).

A escassez de água e as altas temperaturas na região do semiárido, bem como os poucos recursos tecnológicos disponíveis para o uso em sistema de cultivo de feijão-caupi, são os principais responsáveis pela baixa produtividade na região (FERNANDES-JUNIOR & REIS, 2008; FERNANDES-JUNIOR et al., 2012; MARINHO et al., 2014). Porém, uma das características mais importantes das leguminosas é a FBN, esse fator é resultante da interação simbiótica da planta (leguminosa), com as bactérias fixadoras de nitrogênio, vulgarmente denominadas de rizóbio. Quando inoculado, o feijão pode atingir altos níveis de produtividade, o que pode ser bem relativo quanto a contribuição da FBN, tendo em vista que em alguns casos, o fornecimento de N pode chegar a 40% ou 90% do total de N requerido pela cultura. Rocha et al., (2007) não recomendam a adubação nitrogenada, tendo em vista que o feijão-caupi é uma leguminosa que se beneficia da associação simbiótica com bactérias que tem a capacidade de fornecer todo o N requerido pela planta. Entretanto, Zilli et al., (2009), não descartam a utilização da adubação nitrogenada, recomendando-a em caso de baixa nodulação.

A adoção de inoculantes como fonte de fornecimento de N para o feijão, é uma alternativa de baixo custo para aumentar a produção de grãos e garantia de conservação dos recursos naturais (MARINHO et al., 2014). Plantas que foram inoculadas com as estirpes rizobianas: BR 3262, BR 3299<sup>T</sup>, INPA 03-11B, e UFLA 03-84 (*Bradrhizobium sp.*), obtiveram produção semelhante a adubação química nitrogenada com  $80 \text{ kg/ha}^{-1}$  de N, o que comprova a eficiência da inoculação com o rizóbio, e afiança, que a fixação biológica de nitrogênio pode, dependendo da cultivar e da estirpe empregada na inoculação, dispensar a adubação nitrogenada química.

É de fundamental importância a realização de mais estudos envolvendo a vasta quantidade de cultivares de feijão-caupi existentes no mercado, associadas as mais diversas estirpes de rizóbio já conhecidas e desenvolvidas até então, a fim de se encontrar nesses ensaios, as cultivares e estirpes que melhor formam interação simbiótica, expressas em altas produtividades de grão dessa cultura.

### 3.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

As plantas requerem diversos tipos de compostos para poderem atingir seu desenvolvimento de forma integral, e conseqüentemente, chegar a seu principal objetivo que é a reprodução. Grande parte dos compostos utilizados por elas se encontram no solo e até mesmo, livres na atmosfera. De maneira funcional, o nitrogênio (N) é um dos elementos mais importantes para os seres vivos, porque é constituinte fundamental de biomoléculas, sendo encontrado na estrutura dos nucleotídeos que formam os ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente (TAIZ & ZAIGER, 2013). Duas fontes de N estão disponíveis para as plantas, em particular as leguminosas, a primeira é o N mineral advindo do próprio solo, ou mesmo da adubação química, a segunda, através da fixação biológica feita por bactérias diazotróficas (RUMJANEK et al., 2005).

Embora a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), seja o processo responsável pela maior parte do N fixado no solo, em torno de 90%, que o caracteriza como o mais importante, existem outras maneiras naturais pelas quais o N é fixado, como por exemplo; os relâmpagos e as reações fotoquímicas (TAIZ & ZAIGER, 2013). Tendo em vista a necessidade de N para as plantas e principalmente para os seres humanos que dependem indiscutivelmente delas. A FBN é um dos processos biogeoquímicos de grande importância para a vida no planeta. Se este processo fosse interrompido, a vida no planeta terra estaria extinta em poucas décadas (ZILLI et al., 2009).

A interação dos micro-organismos fixadores de N com as leguminosas acontece na rizosfera, a região do solo, onde os processos mediados pelos micro-organismos, são especificamente influenciados pelo sistema radicular das plantas (SOUZA et al., 2015). Isso quer dizer, que há um processo integrado acontecendo nesse ambiente, esta zona inclui o solo ligado às raízes das plantas e muitas vezes, se estende poucos milímetros da superfície das raízes, sendo um ambiente importante para as interações entre esses organismos (LYNCH, 1990; CINZENTOS & SMITH, 2005; SOUZA et al., 2015).

Várias famílias de plantas são capazes de se associar simbioticamente à BFNs (Bactérias Fixadoras de Nitrogênio), porém, a associação de rizóbios é mais comumente debatida e estudada em fabáceas (LACERDA, et al., 2004; FERNANDES-JÚNIOR, et al., 2008; LEITE, et al., 2009; MELO e ZILLI, 2009; ANTUNES, et al., 2011; BRITO, et al., 2011; FERNANDES-JÚNIOR, et al., 2012; MARINHO, et al., 2014; RADL, et al., 2014;

MARINHO, et al., 2017; ARGAW e MULETA, 2017). O processo de nódulação, onde há o alojamento da bactéria no organismo vegetal, se dá por uma série de processos específicos, geralmente desencadeados por respostas a estímulos bioquímicos. O sistema de secreção de proteínas do tipo III, também conhecido como T3SS, além de desempenhar um papel importante na patogenicidade de várias bactérias, é responsável pela secreção de proteínas efetoras, encarregadas de induzir modificações morfo-fisiológicas no hospedeiro. O reconhecimento simbiótico entre macro e microssimbiontes, se dá pela exudação de sinais-chave, no caso da nodulação, fatores nod, que possibilitam o reconhecimento simbiótico entre os dois indivíduos. Na família rizobiace, a secreção dessas proteínas diretamente nas células do hospedeiro induz a formação de nódulos. Entretanto, cabe ressaltar que os genes da nódulação não são expressos de forma significativa em quanto a bactéria se encontra em vida livre, porém, os compostos denominados flavonóides, liberados pelas células corticais das raízes da planta ativam esses genes, ativando a liberação de fatores nod. (LYRA et al., 2008).

Os nódulos são estruturas especializadas onde a bactéria fica alojada fixando o  $N_2$  atmosférico (SILVA e UCHIDA, 2000; LYRA et al., 2008; TAIZ e ZEIGER, 2013; GANO-COHEN et al., 2016; ARGAW e MULETA, 2017).

O feijão-caupi apresenta uma alta promiscuidade quanto a nodulação com BFN (TAMPAKAKI et al., 2017), essa baixa seletividade por parte das plantas faz com que, tratando-se de fixação de N, ocorra uma diminuição da eficiência do N fixado devido a competição com bactérias que mais induzem a nodulação do que a fixação do N (XAVIER et al., 2006).

No feijão-caupi, o suprimento inicial de N vem inteiramente dos cotilédones e do solo, e segue até aproximadamente os 20 DAE, depois desse período, por volta dos 25 dias, a planta passa a retirar esse macronutriente principalmente da FBN, garantindo sua disponibilidade até o período de floração (BRITO et al., 2011).

Embora muito se ouça falar sobre a FBN em leguminosas, esse tipo de associação não é restrito às fabáceas em particular, mas também à outras famílias de plantas. Alguns gêneros BFN são capazes de formar associações também com plantas não leguminosas, como a cana-de-açúcar por exemplo (DÖBEREINER et al., 1995; BALDANI et al., 2014).

### 3.3. EMISSÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA (GEE) NA AGRICULTURA

Com o advento da revolução industrial, iniciada na Inglaterra no início do século XVIII, expandindo-se pelo mundo a partir do século XIX, houve profundas mudanças nos hábitos da sociedade, em que o trabalho do homem foi substituído pelo trabalho da máquina. Iniciaram-se a produção de bens de consumo em massa, havendo melhora significativa na qualidade de vida da população mundial (CARMO et al., 2010). Em contrapartida, o meio ambiente passou por diversas modificações, vários fenômenos naturais foram afetados e até mesmo interrompidos pelas ações antrópicas. Costa et al. (2006) enfatizam que esses impactos são imprecisos, porém o que se sabe, é que pequenos aumentos na temperatura, podem ocasionar excessos ou déficits hídricos em algumas regiões, causando, o desaparecimento de cidades costeiras pelo aumento do nível dos oceanos. O aumento da temperatura se dá pelo acúmulo de gases na atmosfera, os chamados gases de efeito estufa (GEE).

Quando se fala em emissão de GEE, os mais relevantes para o desencadear desse fenômeno são; o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), o metano ( $\text{CH}_4$ ) e o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), responsáveis pelas emissões na atmosfera de 1,638 bilhões de toneladas, 18,1 milhões de toneladas e 546 mil toneladas, respectivamente, dados do ano de 2005, de acordo com Cordeiro et al., (2011).

Segundo o relatório do Painel Intergovernamental sobre mudanças climáticas (IPCC, 2001), o Brasil, até em que esse relatório foi lançado, já sofria impactos com as mudanças climáticas e era considerado mais vulnerável a eventos naturais de maior intensidade. O País é signatário do protocolo de Quioto com ações já finalizadas. Uma das ações lançadas pelo Brasil foi o inventário das emissões de GEE pela agropecuária citado por LIMA et al. (2001), onde destacam a realização de pesquisas em âmbito nacional direcionada a emissões em sistemas de produção vegetal.

Como já relatado anteriormente, a pecuária e a agricultura, são os setores que mais emitem GEE no Brasil (SEEG, 2015). Por outro lado, é importante destacar que a agricultura, embora sendo um dos setores que mais emite esses gases, é também, um dos setores da atividade humana mais vulnerável aos efeitos de possíveis alterações climáticas, com repercussões negativas no que se refere à segurança alimentar em escala global (IPCC, 2001; COSTA et al., 2006). Mesmo diante do extensivo uso atual dos sistemas de irrigação, grande parte da produção agrícola mundial é dependente das chuvas.

As emissões causadas especificamente pela agropecuária são distribuídas em cinco grupos de atividades: produção animal e vegetal, uso de fertilizantes nitrogenados na

agricultura, disposição de dejetos animais e cultivo em Organossolos. Entretanto, a agricultura chega a ser responsável por quase 60% das emissões brasileiras quando as emissões relacionadas indiretamente com a produção agropecuária são contabilizadas. São elas: emissões provenientes do desmatamento dos ecossistemas naturais para expansão agrícola, do uso de combustíveis fósseis na agricultura e do tratamento de efluentes industriais (SEEG, 2015).

Quando o solo é cultivado, ocorre alteração na magnitude do influxo e do efluxo de  $\text{CO}_2$  no sistema solo atmosfera, com reflexos nos estoques de Carbono (C) orgânico do solo. Normalmente, o cultivo do solo resulta na diminuição dos estoques de C orgânico, resultante do aumento do efluxo de  $\text{CO}_2$  para atmosfera e diminuição do influxo de C fotossintetizado no solo (COSTA et al., 2006).

O C principalmente na forma de  $\text{CO}_2$  da atmosfera é transformado em carbono da biomassa, por meio da fotossíntese, processo que utiliza luz solar para sintetizar compostos orgânicos nas plantas (CORDEIRO et al., 2011). O  $\text{CO}_2$  e o  $\text{CH}_4$  possuem C em sua constituição, assim quando há desmatamento e conseqüentemente queimadas, esse carbono é novamente lançado para a atmosfera (Aumento do efluxo e diminuição do influxo).

O mesmo acontece com o  $\text{N}_2\text{O}$ , que possui em sua constituição o N, e como visto anteriormente de acordo com o SEEG (2015), uma relevante causa para o aumento das emissões de GEE na agricultura, é a utilização da adubação nitrogenada nos sistemas de cultivos convencionais vigentes, sendo responsável por 7% de toda emissão de GEE no Brasil, assim, faz-se necessário buscar meios e novas práticas de cultivo, para reduzir a utilização desse tipo de insumo agrícola, evitar modificações drásticas no ambiente, usar adubos orgânicos, consórcios com leguminosas, optar pelo plantio direto e utilizar a prática da inoculação com BFN, nos cultivos.

#### 3.4. BIOCHAR: USO DE BIOMASSA PIROLISADA NA AGRICULTURA

Carvão derivado de biomassa (biochar) é uma fonte versátil de energia renovável com o potencial de gerar calor, eletricidade e biocombustíveis líquidos. O uso do biochar não é novo na agricultura segundo Baumann, (1960) e Eden et al. (1984). Porém, com o aquecimento global e a necessidade de minimizar o efeito dos GEE, a produção de produtos sólidos de biomassa vem tomando força na agricultura (Lehmann, 2007).



O Biochar, também conhecido como *Black Carbon*, é qualquer material rico em carbono obtido de biomassa carbonizada, para uso como condicionador de solos, na elaboração desse material, praticamente qualquer fonte de biomassa pode ser carbonizada (MAIA, 2010), o grande diferencial dessa técnica, é que nesse caso, o material vegetal passa por um processo de combustão conhecido como pirólise, definida por Petter (2010) como sendo a queima do material vegetal em condições controladas, com baixa ou nenhuma presença de oxigênio (O).

No processo tradicional de carbonização, aproximadamente 35% do carbono da madeira é fixado no carvão vegetal e o restante é emitido no ambiente na forma de fumaça e gases não condensáveis ( $\text{CO}_2$ , CO,  $\text{CH}_4$  etc.). Entretanto, há tecnologias que são capazes de recuperar esses subprodutos da carbonização, na forma de gases condensados, em até 50% desse carbono perdido, minimizando a poluição do meio ambiente. No processo de pirólise, muitos compostos voláteis são perdidos, porém durante a conversão térmica, os esqueletos de carbono e os minerais ajudam a manter a estrutura rudimentar e porosidade do material inicial (PETTER, 2010). Quando se fala de condicionador de solos, o biochar pode se comportar diferentemente dependendo de que material ele foi originado, quando produzido a partir de *Eucalyptus sp.* por exemplo, o biochar apresenta características físicas bastante significativas, possuindo alta área de superfície específica, devido a sua porosidade (SANTOS et al., 2011).

Além de ser um material com porosidade e superfície específica destacáveis, o carbono proveniente do processo de pirogênese é uma das frações com maior média de vida no ambiente, frações contendo carbono pirogênico são encontrados nas Terras Pretas de Índios da Amazônia em grandes quantidades e com idades que variam de 500 a 7.000 anos (PETTER et al., 2010), há registro desse material encontrado em outras áreas com idade de até 10.000 anos (CARMO et al., 2010) isso só ressalta confirma mais a importância desse composto nos cultivos agrícolas como melhorador das características do solo, assim como uma ótima forma de minimizar as emissões de GEE.

Com os vários estudos realizados a cerca das mudanças no solo através do implemento de biochar (SANTOS et al., 2011; LIN et al., 2016; LIMA et al., 2016), o interesse pelos efeitos desse material sobre a comunidade microbiana do solo, assim como sua influência sobre bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio e do metano vem sendo recorrente (WARNOCK et al., 2007; LEHMANN et al., 2011, ABUJABHAH et al., 2017). Embora ainda exista uma escassez de estudos para elucidar essa vasta gama de perguntas a

cerca de um sistema tão complexo como a fração biológica do solo, já se sabe que o uso do biochar tem efeito positivo sobre as frações físico-química do solo, o que conseqüentemente afeta a atividade microbiana (ABUJABHAH et al., 2016; ABUJABHAH et al., 2017).

Alguns trabalhos com biochar e FBN, tem mostrado um aumento na fixação de N no solo (RONDON et a., 2007; QUILLIAM et al., 2013). Porém, esse fato não se dá pelo aumento das comunidades microbianas relacionadas á fixação de N<sub>2</sub> atmosférico, mas sim, a disponibilidade de micronutrientes como (B) boro e (Mo) molibdênio (LEHMANN et al., 2011).

Estudando os efeitos do biochar sob a nodulação e atividade nitrogenase em plantas de trevo (*Trifolium repens* L.), Quilliam et al. (2012), observaram que nessas plantas, o efeito do biochar diminui a formação de nódulos nas plantas, o que pode ser explicado por uma maior fixação de nitrogênio e conseqüentemente ao fato de haver uma maior disponibilidade de N fixado, que seria o bastante para atender as necessidades da planta. Porém esse fato deve ser melhor abordado para outras espécies de plantas, tendo em vista, que em soja (*Glycine max* L.) a incorporação de biochar ao solo, eleva tanto o crescimento da planta quanto a nodulação (GLODOWSKA et al., 2017). É importante discutir a interação dos micro-organismos do solo enquanto a aplicabilidade do biochar, levando-se em conta as descobertas feitas quanto as incríveis modificações físico-químicas desse ambiente. Recentemente foram avaliadas as interações entre o carvão vegetal pirolisado e o ciclo do nitrogênio. Cayuela et al. (2013), estudando os efeitos do biochar sobre as emissões de N<sub>2</sub>O em 14 solos, constataram diminuições que vão de 10 a 90%. No entanto, cabe salientar, que é necessário, a realização de outros estudos tendo em vista elucidar os vários questionamentos ainda existentes a cerca dessa atraente alternativa para mitigar as emissões de GEE (SÁNCHEZ-GARCÍA et al., 2014). Esses autores enfatizam os controversos resultados demonstrados na literatura, em que em alguns solos a aplicação de biochar diminui as emissões de N<sub>2</sub>O, enquanto em outros aumenta.

### 3.5. CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIO POR MEIO DE FERRAMENTAS MOLECULARES

A necessidade de estratégias confiáveis para investigar a diversidade entre populações de rizóbios, uma gama de técnicas foi desenvolvida, incluindo especificamente os métodos moleculares (DOIGNON-BOURCIER et al., 2000). Tendo em vista essa baixa

seletividade por parte do macrosimbionte, faz-se necessário a seleção de estirpes que melhor possam ser exploradas economicamente, proporcionando ao mercado uma seleção de inoculantes à base de bactérias altamente eficientes (MARINHO et al., 2017).

A Técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) revolucionou os métodos para o estudo de diversidade, e consiste na hibridização de sequências gênicas específicas usando oligonucleotídeos (iniciadores) (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999, FERNANDES et al., 2003)). Os métodos de *fingerprinting* ou impressão digital são bastantes usados para eliminar isolados que possuem o mesmo perfil genético. Dentre os os mais estudados está o BOX-PCR, por ser um método rápido e preciso (HUNGRIA et al., 2008), e usa sequências repetitivas e palindrômicas. (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999).

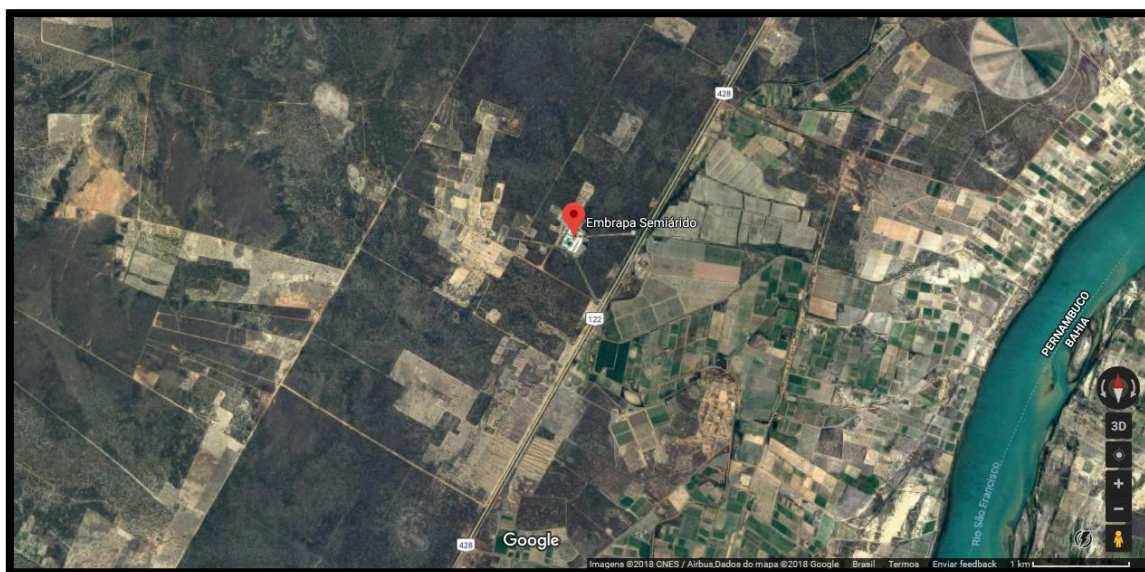
De forma mais abrangente, a reação em cadeia de polimerase, permite associar-se a outras técnicas como Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP-*restriction fragment length polymorphism*) é muito utilizada em estudos taxonômicos por ser simples e abranger diversas regiões do genoma, incluindo as não transcritas, onde o fragmento é clivado por endonucleases do fragmento específico, aumentando a eficácia dos estudos de diversidade (FERNANDES et al., 2003. A Técnica de ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado) aplica o gene 16S rRNA ribossomal e este fragmento é cortado por enzimas de restrição que também vai gerar um perfil genético e agrupamento mostrado através de um dendrograma usando programas bioinformáticos (Leite et al., 2009).

Outra técnica a IGS-RFLP das regiões intergênicas ribossomais (IGS) vêm sendo aplicada e são ferramentas importantes para os estudos de filogenia. (DOIGNON-BOURCIER et al., 2000; FAZAELI et al., 2000; WEI et al., 2003; JAISWAL et al., 2017; TAMPKAKI et al., 2017;). A região correspondente ao espaço intergênico é mais passível de modificações evolutivas que outras sequências ribossomais, além de ter regiões muito conservadas como partes dos genes 16S e 23S rRNA, além de todo o gene 5.8S rRNA. Dessa forma possui boa capacidade de fornecer informações filogenéticas sobre o organismo estudado (FAZAELI et al., 2000).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O ensaio foi conduzido no Campo Experimental da Caatinga no Setor de Metabolismo Animal pertencente à Embrapa Semiárido, situada no município de Petrolina-PE (09° 09' S de 40° 22' W) (**Figura 1**). O clima da região é caracterizado como BSw<sub>h</sub>, segundo classificação de Köppen. O período de chuvas para a região é de janeiro a abril, com uma precipitação média de 535,5 mm anuais e com uma temperatura média anual de 26,0°C. A vegetação natural predominante no município é de mata nativa de Caatinga hiperxerófila.

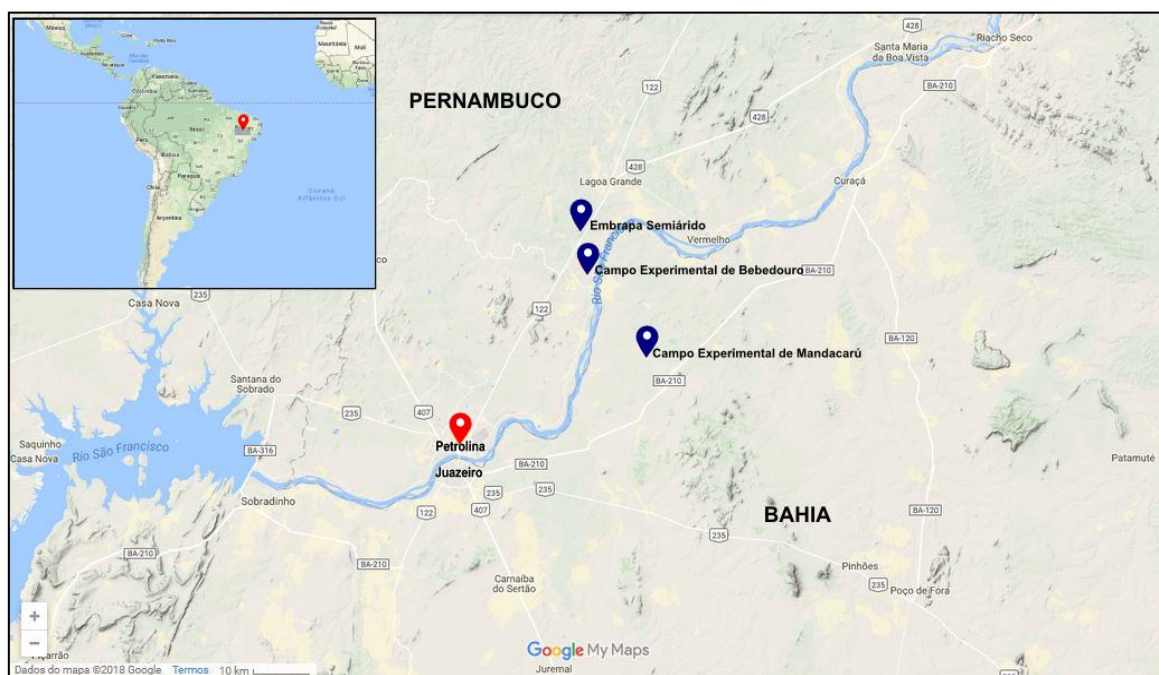


**Figura 1:** Localização da Embrapa Semiárido (imagem Google Earth 2017).

### 4.2. INSTALAÇÃO, COLETA E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

O ensaio teve início no mês de novembro de 2017 e terminou no mês de janeiro do mesmo ano. O experimento seguiu um esquema fatorial de 2 (solos) x 2 (biochar) x 4 (tratamentos de inoculação). O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições. Foram utilizados como tratamentos: dois solos, um Argissolo (ARS) proveniente da estação experimental de Bebedouro (Petrolina, PE 09°09'S; 40°22'W) e um Vertissolo (VRS) originário da estação experimental de Mandacará

(Juazeiro, BA 09°24'S; 40°26'W), ambos pertencentes à Embrapa Semiárido (**Figura 2**), a aplicação ou não do biochar incorporado ao solo ( $15\text{g/kg}^{-1}$  de solo) e quatro tratamentos de inoculação descritos a seguir: duas estirpes de *Bradyrhizobium* BR 3267 de *B. yuanmingense*, autorizada pelo MAPA para a produção de inoculantes para o feijão-caupi (Martins et al, 2003); ESA 17 de *Bradyrhizobium* sp., estirpe em fase de seleção para o feijão-caupi pela Embrapa Semiárido (Marinho et al., 2017), um controle nitrogenado (com aplicação de N-Uréia na dose dosagem de  $80\text{ Kg ha}^{-1}$ ), além de um controle absoluto (sem inoculação ou adubação com N), constituindo assim, um esquema fatorial completo.



**Figura 2:** Localização dos pontos de coleta dos dois solos: (ARS) proveniente da estação experimental de Bebedouro e (VRS) originário da estação experimental de Mandacarú, ambos localizados no vale do São Francisco.

**Tabela 1:** Resultados das análises físicas dos solos utilizados no experimento Argissolo (ARS) e Vertissolo (VRS).

Localidade	Solos	Densidade		Porosidade Total (%)	Granulometria		
		Solo	Partículas		Areia	Silte	Argila
		(kg/dm <sup>3</sup> )		(g/kg)			
Bebedouro	ARS	1,29	2,60	50,17	773,7	153,7	72,6
Mandacarú	VRS	1,21	2,43	50,26	395,6	242,7	361,7

**Obs:** ARG = Argissolo; VRS = Vertissolo

**Tabela 2:** Resultados das análises químicas dos solos das comunidades Bebedouro e Mandacarú. Argissolo (ARS) e Vertissolo (VRS).

Local	Solo	C.E	pH	C	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V
		mS cm <sup>-1</sup>												g hg <sup>-1</sup>
Bebedouro	ARS	0,44	5,5	2,3	8,03	0,09	0,03	1,5	0,60	0,00	1,7	2,2	3,9	57,0
Mandacarú	VRS	0,45	7,7	7,4	5,94	0,25	0,08	16,7	1,90	0,00	0,2	18,9	19,2	98,7

**Obs:** ARG = Argissolo; VERT = Vertissolo; SB = saturação de bases, CTC = Capacidade de troca de cations, V = Saturação de bases e C.E. = Condutividade elétrica.

Os solos foram coletados a uma profundidade de 20 cm, uma alíquota foi retirada para realização da análise física e química (Tabelas 1 e 2). Para preparação do biochar, foi utilizado carvão vegetal produzido a partir de algaroba [*Prosopis juliflora* (Sw) DC], o mesmo foi moído em forrageira até que se formasse um fino pó, em seguida foi esterilizado por meio de autoclavagem.

Para o enchimento dos vasos com capacidade para 12 kg, o solo foi destorroado, peneirado e homogeneizado, pesado e adicionado 15g kg<sup>-1</sup> de biochar para os tratamentos com a aplicação do condicionador. Para uma boa homogeneização do carvão ao solo, o material foi colocado em sacos plásticos e revolvidos manualmente até que todo o material estivesse homogeneizado. Os vasos foram dispostos no campo, a céu aberto e receberam as bases das câmaras, que foram inseridas cerca de 5 cm no solo (Figura 4 A e C). Tendo em vista a coleta de gases, os vasos receberam água deionizada durante oito dias em um total de 1 L diário antes do plantio do feijão-caupi, isso para que o material, assim como as atividades microbianas pudessem se estabilizar, antes da primeira coleta de gás.

Para a preparação dos inoculantes, as bactérias foram crescidas em meio de cultura líquido YM com Azul de Bromotimol (Vincent, 1970), em temperatura ambiente por seis dias sob agitação orbital constante de 120 rpm.

Utilizou-se a cultivar BRS Marataoã para o plantio do feijão-caupi. As sementes foram previamente desinfestadas superficialmente com etanol 96° GL (30 segundos), NaClO (hipoclorito de sódio) 2% (v/v) (2 minutos) e seguiu-se de oito lavagens em água destilada e autoclavada (ADE). Foram semeadas 4 sementes por vaso e aplicado com o auxílio de uma pipeta sobre as sementes já semeadas, um total de 4 ml de meio YMA contendo as bactérias já crescidas, os vasos receberam água deionizada diariamente. Oito DAE (dias após emergência), as plantas foram desbastadas utilizando-se uma tesoura de poda, deixando-se apenas uma planta por vaso.

A coleta do experimento se deu 45 DAE, as plantas foram cuidadosamente removidas dos vasos para evitar maiores perdas de raízes e nódulos. A parte aérea foi separada das raízes e colocada em sacos de papel devidamente identificados. As raízes foram lavadas cuidadosamente para remoção das partículas de solo e biochar e secas ao ar durante uma hora, os nódulos foram destacados, contados e postos em sacos de papel devidamente identificados com cada tratamento. Tanto a parte aérea, quanto os nódulos (já contados) e as raízes, já acondicionados em sacos de papel identificados foram postos para secar em estufa de circulação forçada durante 4 dias a 65°C. Os componentes separados da planta (parte aérea, raízes e nódulos), após atingirem massa constante, foram pesados em balança analítica de precisão para determinação da massa da parte aérea seca (MPAS), massa das raízes secas (MRS) e massa de nódulos secos (MNS).

No momento da coleta das plantas, alíquotas com média de 500 g de solo foram recolhidas de cada vaso, postas em sacos plásticos, identificadas e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Solos e Material Vegetal da Embrapa Semiárido onde foram feitas análises químicas e físicas dos solos submetidos a cada tratamento ao fim do experimento.

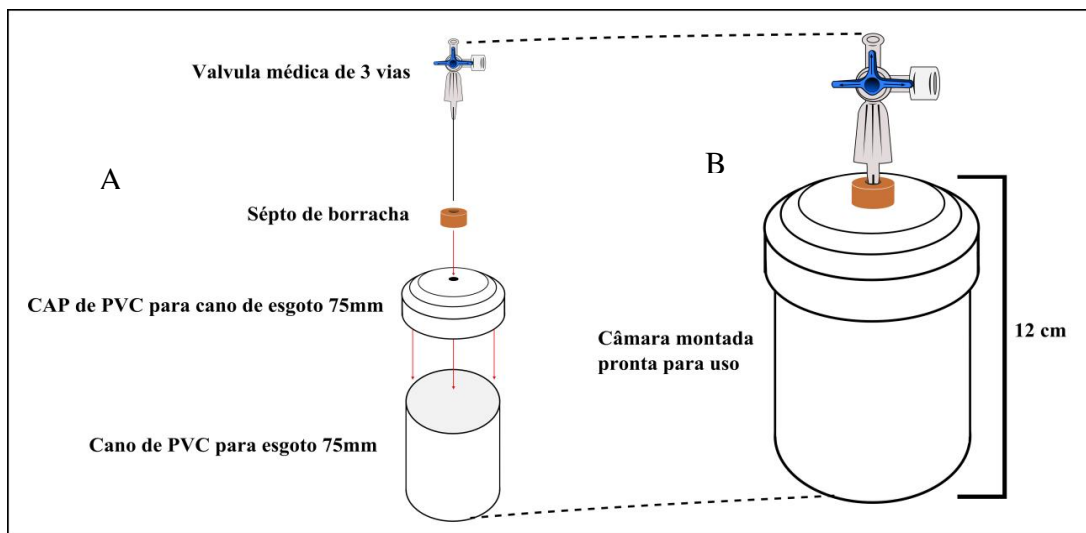
Foram utilizadas as partes aéreas das plantas, incluindo folhas, ramos e caule, para determinação do teor de N na parte aérea. Após seca em estufa de circulação forçada por quatro dias a 65°C, a parte aérea da planta foi moída em moinho de bola tipo Wiley. As amostras foram analisadas pelo método em analisador elementar TruSpec LecoSorb CN (Leco, EUA). O N total na parte aérea foi calculado por meio da multiplicação do teor de nitrogênio ( $\text{mg g}^{-1}$ ) pela massa da parte aérea (g).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F de acordo com o delineamento experimental adotado e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ( $p < 0,05$ ). O software utilizado para análise estatística foi o SISVAR versão 5.6.

#### 4.3. PLANEJAMENTO E CONFECÇÃO DAS CÂMARAS E COLETA DOS GEE

Para determinação das emissões de gases do efeito estufa (GEE) nos vasos, foram construídas 64 câmaras feitas com canos de PVC (Policloreto de vinila) para esgoto, com diâmetro de 75 mm (4.59% da superfície dos vasos). As câmaras se dividiam em base (haste de PVC) medindo 15 cm de comprimento e tampa (tampa ou “cap” de PVC), que quando acoplados somavam uma altura de 17 cm, no entanto, após acopladas no solo, foi feita uma média das alturas das câmaras totalizando em torno de 12 cm (Figura 3), com

isso foi calculado para a câmara em sua “totalidade” o volume de  $750,6 \text{ cm}^3$ , porém tendo em vista o acoplamento das bases no solo, cerca de 5 cm ficaram submersos, considerar-se como volume útil da câmara, apenas a parte sobre o solo (Figura 4 B), uma média de 12 cm, assim, o volume médio final da câmara foi de  $529,8 \text{ cm}^3$ .



**Figura 3:** (A) Componentes para construção da câmara de coleta de GEE, (B) câmara pronta para uso, com altura total após fixada no solo.

Foram preparadas para cada câmara um total de 2 seringas, acoplando-se ao bico de cada seringa uma válvula médica de 3 vias (TRO-VENOFLOW 3 VIAS), que evitava a perda do gás até que fosse transferido para os “vials”. Por fim, cada seringa foi identificada com cada tempo de coleta (0, e 10 min.).





**Figura 4:** (A) Distribuição dos tratamentos em campo, (C) Bases das câmaras fixadas ao solo, (B) Câmara com todos os componentes e pronta para coleta dos GEE.

#### 4.4. COLETA DOS GASES

Para a preparação dos vials para receber as amostras de gases coletados, os mesmos eram hermeticamente fechados com o auxílio de um crimpador ergonômico manual (AGILENT TECHNOLOGIES) e identificados de acordo com cada tempo de coleta, respectiva câmara e tratamento. Em um período de 48 horas antes de cada coleta de gás, os vials eram submetidos ao vácuo em uma bomba de alto vácuo (SYMBOL VÁCUO).

As coletas eram realizadas obedecendo a ordem dos blocos (B1, B2, B3 e B4). No momento das coletas, os “caps” eram acoplados às bases já fixas no solo, iniciando-se a captura com o auxílio das seringas, obedecendo aos tempos pré-definidos (0 e 10 min.) iniciando-se o cronômetro a partir da colocação de cada cap. Em cada tempo de coleta, eram registradas as temperaturas do solo (nos vasos) e do ar. Após as coletas, os vials eram transportados para o Laboratório de Cromatografia da Embrapa Semiárido. As concentrações de  $N_2O$  (Óxido nitroso),  $CO_2$  (Dióxido de carbono) e  $CH_4$  (Metano) nas amostras foram determinadas em cromatografia gasosa em cromatógrafo Agilent 7890A GC System. Para os cálculos dos fluxos dos GEE, cada uma das quatro amostras coletadas nos vasos (nos diferentes tempos) foram injetadas individualmente e após a determinação

das concentrações em cada tempo, o fluxo foi calculado em cada parcela por meio da integração dos dados.

#### 4.5. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Para o isolamento dos rizóbios foi realizado um experimento em condições de casa de vegetação na sede da Embrapa Semiárido. Para este ensaio, foi utilizado o mesmo biochar que foi processado e adicionado aos vasos como descrito anteriormente. A cultivar de feijão-caupi (BRS Marataoã) foi utilizada como planta-isca e semeada em vasos com volume de 3 L de substrato. As amostras de solo usadas foram as mesmas descritas anteriormente. Da mesma forma a incorporação do carvão ao solo foi realizada conforme descrito para o experimento anterior.

Após 8 dias de emergência (DAE), as plantas foram desbastadas, deixando-se apenas uma planta por vaso, aos 35 DAE, as plantas foram coletadas.

O isolamento das bactérias foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido. Na coleta, as raízes foram separadas da parte aérea e lavadas em água corrente, cuidadosamente. Os nódulos foram removidos das raízes e logo após a remoção foram desinfestados superficialmente em etanol 96° GL por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 7 minutos seguido de 8 lavagens em ADE. Após a desinfestação, os nódulos foram esmagados com uma pinça e seu conteúdo disposto em placas de Petri como meio YMA com vermelho congo (Vincent, 1970). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 10 dias e o aparecimento de colônias isoladas foi monitorado diariamente. Ao se constatar o crescimento das colônias isoladas, as bactérias foram purificadas novamente em placas de Petri com meio YMA com azul de bromotimol até a obtenção de colônias puras. Após a purificação, as bactérias foram estocadas em meio YMA líquido com glicerol e armazenadas em ultrafreezer a -80°C na Coleção de Microorganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA).

#### 4.6. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para extração do DNA genômico, as bactérias estocadas foram repicadas em placas de Petri com meio YMA com azul de bromotimol, para conferência da pureza. Após constatado o crescimento puro das colônias, foi feita uma cultura de células em meio YM

líquido, sem indicador, utilizando-se 5 ml de meio em tubos de ensaio com volume de 15 ml. As bactérias foram incubadas em agitador orbital a 125 rpm durante 6 dias em temperatura ambiente. Para extração do DNA genômico bacteriano utilizou-se o kit de extração Wizard Genomic DNA Clean-Up System (Promega) seguindo-se o protocolo do fabricante.

#### 4.7. PCR E AMPLIFICAÇÃO DE ESPAÇO INTERGÊNICO - IGS

Utilizando o DNA extraído, foi feita a amplificação da região intergênica 16S-IGS1-5.8S-IGS2-23S 16S-23S (*intergenic spacer region*) para a caracterização genotípica das bactérias obtidas no isolamento. Para uma melhor compreensão a cerca das posições filogenética dos isolados, foi feita também a amplificação do IGS de 7 bactérias referências (*Bradyrhizobium ingae* BR 10247, *Bradyrhizobium sp.* BR 2003, *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 6144, *Bradyrhizobium neotropicale* BR 10247, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* LMG 8830 e *Ensifer sp.* USDA 192), que foram gentilmente cedidas pela curadoria do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ). A reação de PCR foi dimensionada para 26 µL, contendo reação tampão de 1X 2,6 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,4 µl, dNTP 1,09 µl, Taq DNA polimerase 0,2 µl, água Milli-Q 18,03 µl e 0,52 µl de cada iniciador. Os primers utilizados para a amplificação do IGS foram IGS-F1-T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCG-3') e IGSbrd-R1-SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAGGCTTCTTCGCAGCTCCCCACG-3') (Tampakaki et al. 2017). A reação de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, e 72°C por 2 min com uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE a 0,5X.

#### 4.8. REAÇÕES DE RESTRIÇÃO E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS

Após amplificação do IGS, os produtos de PCR foram digeridos utilizando-se as endonucleases: *Hind* III, *Hin* 6I e *Alu* I. As reações de restrição foram dimensionadas para 16 µl, contendo: 8 µl da reação de PCR e 8 µl das soluções contendo as endonucleases. Cada enzima foi preparada adotando-se as recomendações do fabricante. As soluções contendo o DNA e as respectivas enzimas foi encubado em estufa tipo BOD a uma temperatura de 37°C por 16 horas (*overnight*). O material digerido foi analisado em gel de

agarose a 2% em tampão TBE 0,5X, aplicando-se uma voltagem de 100 V por 3 horas. Os géis foram observados em transluminador com luz UV e fotografados em fotodocumentador. A avaliação dos perfis de restrição foi feita com o programa BioNumerics v. 7.6. Para a construção do dendrograma de similaridade foi utilizado o coeficiente de Dice, e o algoritmo UPGMA, aplicando-se a tolerância de 2%.

#### 4.9. *FINGERPRINTING* MOLECULAR POR MEIO DA TÉCNICA DE BOX-PCR.

Os perfis que apresentaram 100% de similaridade entre si na técnica de IGS-RFLP, foram submetidos à avaliação do *fingerprinting* molecular por meio da técnica de BOX-PCR. Foi utilizado o iniciador BOX-A1 (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3') (Versalovic et al., 1994). A reação de PCR foi dimensionada para 25 µL, contendo reação tampão de 1X 2,5 µl; MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl; dNTP 5,0 µl; Taq DNA polimerase 0,20 µl; água Milli-Q 13,8 µl; DNA 1,0 µl e 1,0 µL (10 mM) do primer. A reação de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 7 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, e 65°C por 8 min com uma extensão final de 65°C por 16 min. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE a 0,5X aplicando-se uma voltagem de 120 volts durante 2,5 horas. Os géis foram observados em transluminador com luz UV e fotografados. A avaliação dos perfis de bandas foi realizada com o programa Bionumerics, conforme descrito acima.

#### 4.10. SEQUENCIAMENTO DO ESPAÇO INTERGÊNICO IGS

Após feita a seleção dos isolados que seriam submetidos ao teste agronômico e sequenciamento, foi realizada então, uma nova amplificação do IGS para essas bactérias, conforme descrito acima. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-up System da (Promega) e enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen, Coreia do Sul. A qualidade das sequências foi verificada utilizando o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems) e, comparadas com sequências de estirpes tipo na plataforma (NCBI) usando BLAST.

#### 4.11. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DOS ISOLADOS

Foram escolhidas para o teste de eficiência 30 bactérias que apresentaram perfis de similaridade diferentes, pela técnica de IGS-RFLP e *fingerprinting* pelo BOX-A1. Os

isolados foram reativados, do estoque, em placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol. Após constatado o crescimento, as bactérias foram repicadas em meio YM sem indicador e sem ágar por 5 dias até que o meio se mostrou turvo com uma contagem de células aproximada de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>.

O experimento foi instalado em casa de vegetação na sede da Embrapa Semiárido, seguindo delineamento experimental inteiramente casualizados (DIC) com 4 repetições e 33 tratamentos, sendo: 30 isolados obtidos neste estudo, 1 controle nitrogenado (sem inoculação e com aplicação de N), uma bactéria referência (BR 3267 de *Bradyrhizobium yuanningense*) e a testemunha absoluta (sem inoculação e sem N).

A variedade de feijão-caupi utilizada foi a BRS Pujante. As sementes foram previamente desinfestadas conforme descrito acima. Foram semeadas 4 sementes em vasos de poliestireno com capacidade para de 500 mL preenchidos com areia autoclavada (duas autoclavagens a 120°C, 1,5 atm por 1 h, com o intervalo mínimo de 72 h entre as autoclavagens). Para a inoculação das bactérias, 4 mL do caldo de cultivo contendo as bactérias crescidas (aproximadamente  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>), foram inoculadas por semente na semeadura. As 10 DAE, as plantas foram desbastadas deixando-se apenas uma planta por vaso.

Os vasos foram irrigados diariamente com ADE, e após a queda dos cotilédones, uma solução nutritiva isenta de N (Norris e Mannelje, 1964) foi aplicada semanalmente. A testemunha nitrogenada recebeu uma dosagem de 50 mg de N na forma de (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) nitrato de amônia por semana.

As plantas foram coletadas 40 DAE. As raízes foram separadas das partes aéreas, lavadas cuidadosamente em água corrente e os nódulos foram destacados e contados para determinação do número de nódulos (NN). Os nódulos, assim como a parte aérea e as raízes foram colocados separadamente em sacos de papel devidamente identificados e em seguida, secos em estufa de circulação forçada a 65°C durante 4 dias até que atingissem massa constante. Após seco o material foi pesado em balança analítica de precisão para determinação dos teores de MPAS, MRS e MNS.

Foram utilizadas as partes aéreas das plantas, incluindo folhas, ramos e caule, para determinação do teor de N na parte aérea. Após seca em estufa de circulação forçada por quatro dias a 65°C, a parte aérea da planta foi moída em moinho de bola tipo Wiley. As amostras foram analisadas pelo método em analisador elementar TruSpec LecoSorb CN (Leco, EUA). O N total na parte aérea foi calculado por meio da multiplicação do teor de

nitrogênio ( $\text{mg g}^{-1}$ ) pela massa da parte aérea (g). Já a eficiência nodular, foi calculada pela divisão do N total ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) pela massa de nódulos (g).

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos, submetidos ao teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). O software utilizado para análise estatística foi o SISVAR versão 5.6.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. EFEITO DO BIOCHAR SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO FEIJÃO-CAUPI

A aplicação do biochar teve influência na nodulação das plantas em função dos diferentes solos. No Argissolo, o número e massa de nódulos nas plantas inoculadas foi reduzido pela aplicação do carvão (Tabela 3). A literatura científica apresenta dados tanto de aumento (LEHMANN et al., 2011; ABUJABAHAH et al., 2017), como de redução da nodulação (QUILLIAM et al., 2013). Essa variabilidade na resposta das plantas e micro-organismos em experimentos com aplicação do biochar se deve a uma série de fatores como as características edafoclimáticas e a composição química da biomassa pirolizada.

Hely et al., (1957) constatou um aumento na nodulação em trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*) em um solo Podzólico Amarelo na Austrália com carvão de incêndios florestais, evidenciando os primeiros indícios dos efeitos positivos do biocarvão sobre rizóbios. Por outro lado, (QUILLIAM et al., 2013) constataram que a nodulação do trevo-branco (*Trifolium repens*) com as bactérias nativas de um solo franco-arenoso em condições de campo na Inglaterra foi reduzida com a aplicação do biochar, entretanto, a atividade fixadora dos nódulos foi igual tanto nos tratamentos inoculados como nos não inoculados. Estes resultados contrastantes demonstram a variabilidade das respostas à aplicação do biochar.

**Tabela 3:** Número e massa de nódulos secos de plantas de feijão-caupi produzidas em dois solos (ARS = Argissolo e VRS = Vertissolo) do Vale do São Francisco com (+ biochar) e sem (- biochar) aplicação de *biochar*.

Tratamentos	Número de nódulos (nódulos/planta)		Massa de nódulos secos (mg/planta)	
	ARS + Biochar	ARS - Biochar	ARS + Biochar	ARS - Biochar
ESA 17	113,3 bAB	228,3 aA	727 bA	1092 aA
BR 3267	43 bBC	164,6 aAB	890 aA	1079 aA
N 80kg/ha <sup>-1</sup>	31,8 bC	129,5 aB	996 aA	920 aA
Controle	149,3 aA	30 bC	648 aA	746 aA
CV%	36,79		22,09	
	VRS + Biochar	VRS - Biochar	VRS + Biochar	VRS - Biochar
ESA 17	241 aA	159,75 bAB	880 aAB	1120 aA
BR 3267	169 aAB	48 bC	1157 aAB	510 bB
N 80kg/ha <sup>-1</sup>	93 bBC	240,25 aA	677 bB	1150 aA
Controle	36 aC	96,75 aBC	1397 aA	1290 aA

<b>CV%</b>	<b>37,95</b>	<b>28,55</b>
------------	--------------	--------------

\*\*Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas linhas em uma mesma variável, e maiúsculas nas colunas, dentro das fontes nitrogenadas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A adição do biochar no Vertissolo beneficiou os inoculantes avaliados, mostrando uma maior nodulação nos tratamentos com os inoculantes. O inoculante ainda em fase de testes pela Embrapa ESA 17, mostrou-se superior a BR 3267 já disponível no mercado. O fato de ter havido uma alta nodulação no controle absoluto do Argissolo, pode ser explicado pela alta diversidade de bactérias noduladoras existentes nos solos (MELO e ZILLI, 2009), conforme será demonstrado para os isolados obtidos neste estudo. O maior número de nódulos no controle absoluto do Argissolo com adição do biochar pode ser explicado, porque esse material possui o poder de mudar as características físico-químicas dos solos (Abuhabhah et al., 2016), e essas características podem ter influências sobre determinadas comunidades microbianas, favorecendo umas e inibindo outras.

Enquanto no Argissolo, comparando-se os tratamentos com e sem aplicação de biochar, é possível observar que o biochar não favoreceu a nodulação nos tratamentos com os inoculantes, o que não houve como no Vertissolo, em que esse composto carbonado promoveu a nodulação em comparação com os tratamentos sem sua adição. Quanto a testemunha nitrogenada, a adição de biochar nos dois solos diminuiu o número de nódulos nas plantas que receberam a dosagem de  $80\text{kg/ha}^{-1}$ , cabe ressaltar que a fonte de nitrogênio utilizada nesse ensaio foi a Ureia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), esse composto nitrogenado após aplicação no solo é mineralizado pela ação microbiana, conseqüentemente, o fornecimento desse mineral em quantidades ideais para a planta, faz com que a mesma não precise promover uma grande formação de nódulos. Berglund et al. (2004), estudando os efeitos do biochar sobre os processos de nitrificação nos solos, confirmam que o biochar favorece os microorganismos responsáveis por esse processo, confirmando assim, um melhor aproveitamento de adubos solúveis e de alta lixiviação em solos com adição de biochar.

Não houve diferenças significativas para os parâmetros massa dos nódulos secos no Argissolo quando comparadas as variáveis. No entanto, quando se compara os mesmos tratamentos com e sem aplicação do carvão, o inoculante ESA 17 mostrou maior massa de nódulos secos, sendo 727 mg contra 1092 mg, para o solo com e sem aplicação do biochar, respectivamente. No Vertissolo por outro lado, a aplicação do biochar favoreceu a nodulação da estirpe BR 3267 quanto à massa dos nódulos secos, embora não tenha diferido estatisticamente, entretanto, a adição desse material favoreceu essa variável para o



controle absoluto mesmo o número de nódulos tendo se mostrado inferior. Comparando-se os tratamentos entre si, com e sem aplicação do biochar no Vertissolo, é possível observar que os melhores resultados, tanto para o número de nódulos quanto para a massa dos nódulos secos, foi superior para o solo que recebeu a dosagem de biochar.

Contudo, pode-se afirmar que o biochar tem efeitos diferentes a depender do solo no qual é aplicado. Uma série de fatores físicos, químicos e biológicos dos solos, assim como a procedência e também o material do qual esse condicionador se origina podem promover mudanças diversas na biota (LEHMANN et al., 2011). De acordo com Hungria e Borher (2000), um número variando de 15 a 20 nódulos na região da coroa da planta e, valores de massa de nódulos secos em torno de 100 e 200 mg (HUNGRIA et al., 2007), é o suficiente para garantir o fornecimento adequado de N para a planta de soja, no entanto, não se tem valores exatos de quantos nódulos por planta de feijão-caupi seriam necessários para fornecer a quantidade de N requerida pela leguminosa em questão, porém, acredita-se que um número de nódulos acima de 65 seja o suficiente para garantir a dose necessária de nitrogênio que o feijão-caupi necessita (SILVA et al., 2016). Neste caso, o biochar proveniente de algaroba foi eficiente na promoção da nodulação no Vertissolo, enquanto no Argissolo mostrou resultados diferentes quanto aos inoculantes avaliados. Os efeitos adversos do biochar estão ligados tanto a granulometria desse solo quanto a baixa fertilidade (BUTNAN et al., 2015), comum na maioria dos solos mais arenosos, como o horizonte A do Argissolo avaliado.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos, para a produção de massa da parte aérea seca em nenhum dos solos (Tabela 4). Os resultados observados para nodulação se refletiram nessas outras variáveis, com o Vertissolo apresentando os maiores teores com a adição do biochar, enquanto no Argissolo teve a produção de biomassa inibida com a aplicação desse material. Cabe ressaltar que, a única diferença estatística apresentada para essa variável, ocorreu entre as testemunhas nitrogenadas do Argissolo, com um maior aporte de massa da parte aérea seca no tratamento sem aplicação do biochar, e que nesse solo os maiores teores de massa da parte aérea seca ficaram entre o controle nitrogenado e o controle absoluto, 13,8 g e 14,55 g, respectivamente, contra 13,225 g e 10,7 g das plantas inoculadas com ESA 17 e BR 3267, respectivamente. Berglund et al. (2004), ressaltam a eficácia do biochar nos processos de nitrificação e também desnitrificação, pois altera a comunidade de micro-organismos responsáveis por esses processos. Pode-se dizer então, que de alguma forma, relacionado ao aporte de nutrientes ou mesmo da granulometria do

Argissolo, o biochar aplicado inibiu a atividade microbiana, interferindo nos micro-organismos responsáveis pela desnitrificação de compostos nitrogenados, como a Ureia aplicada como fonte de N. Cabe ressaltar que nesse ensaio foi utilizado apenas uma dosagem de biochar (15 g kg.solo<sup>-1</sup>), e que outras doses devem ser testadas para melhor se poder chegar a resultados satisfatórios como vem sendo feito a alguns anos (RONDON et al., 2007, ABUJABHAH et al., 2017; SILVA et al., 2017). Entretanto, trabalhos avaliando dosagens de biochar em vasos chegam a aplicar doses de até 200 g de carvão por kg de solo. Ao se extrapolar estas dosagens para toneladas, aplicar-se-ia 200 toneladas de biochar para cada hectare, o que é impraticável do ponto de vista agrônomo. Por este motivo, estabelecemos a dose em 15 g por kg de solo, equivalente a 15 toneladas por hectare, uma dose alta, porém exequível agronomicamente.

**Tabela 4:** Massas da parte aérea e radiculares secas de plantas de feijão-caupi (Variedade BR Pujante) produzidas em dois solos (ARS = Argissolo e VRS = Vertissolo) do Vale do São Francisco com (+ biochar) e sem (- biochar) aplicação de *biochar*.

Tratamentos	Massa da parte aérea seca (g/planta)		Massa da raiz seca (g/planta)	
	ARS + Biochar	ARS - Biochar	ARS + Biochar	ARS - Biochar
<b>ESA 17</b>	13,225 aA	16,350 aA	1,687 aA	1,857 aAB
<b>BR 3267</b>	10,700 aA	15,300 aA	1,957 aA	1,272 aB
<b>N 80kg/ha<sup>-1</sup></b>	13,800 bA	14,775 aA	1,942 aA	2,342 aA
<b>Controle</b>	14,550 aA	15,475 aA	2,307 aA	2,185 aAB
<b>CV(%)</b>	19,65		26,65	
<b>DMS</b>	5,53		1,02	
Tratamentos	Massa da parte aérea seca (g/planta)		Massa da raiz seca (g/planta)	
	VRS + Biochar	VRS - Biochar	VRS + Biochar	VRS - Biochar
<b>ESA 17</b>	16,175 aA	13,200 aA	1,575 aA	1,572 aA
<b>BR 3267</b>	13,975 aA	13,800 aA	1,630 aA	1,745 aA
<b>N 80kg/ha<sup>-1</sup></b>	12,500 aA	11,600 aA	1,462 aA	1,815 aA
<b>Controle</b>	13,825 aA	11,675 aA	1,632 aA	1,715 aA
<b>CV(%)</b>	19,35		19,12	
<b>DMS</b>	5,09		0,61	

\*\*Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas linhas em uma mesma variável, e maiúsculas nas colunas, dentro das fontes nitrogenadas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Mesmo não havendo diferença estatística entre os tratamentos ou mesmo com a adição ou não do biochar, pode-se ressaltar que o condicionador influenciou positivamente a produção de biomassa no Vertissolo assim como aconteceu com a formação de nódulos.

O aumento da biomassa pode ser explicado pela mudança das propriedades químicas do solo, esse material promove um maior aproveitamento dos nutrientes da solução do solo, facilitando sua disponibilidade para as plantas (RONDON et al., 2007; UZOMA et al., 2011).

Além de favorecer o aumento no número de nódulos em alguns solos, Silva et al. (2017), ressalva o aumento também de raízes finas em solos que recebem o biochar como condicionador. Divergindo dessa informação, nesse ensaio não houve diferença estatística para a produção de massa de raiz seca para o Vertissolo, entretanto, de forma controversa essa variável foi estatisticamente diferente quando comparados os tratamentos, sem adição de biochar no Argissolo.

A aplicação de biochar aumenta a fixação de N, tendo em vista favorecer uma maior entrada de N da atmosfera (ABUJABHAH et al., 2016; ABUJABHAH et al., 2017). Entretanto, para este trabalho, a aplicação de biochar não foi relevante para o aporte de N na planta, tendo em vista que não houve diferença significativa para o teor de N foliar (Tabela 5), em nenhum dos solos, embora o N tenha apresentado diferenças significativas para os tratamentos assim com para aplicação do carvão em ambos.

As alterações no NN e MNS, assim como a tímida diferença visual dos números para massa da MPAS são indícios de que a aplicação do biochar tem influência sobre o desenvolvimento fisiológico da planta de feijão-caupi, e que são necessários mais estudos utilizando outras doses de biochar, para se determinar qual a melhor dose desse material no desenvolvimento dessa cultura com a aplicação de inoculantes.

**Tabela 5:** Teores de Nitrogênio foliar de plantas de feijão-caupi (Variedade BRS Pujante) produzidas nos dois solos (Vertissolo e Argissolo) do Vale dos São Francisco com e sem aplicação de biochar.

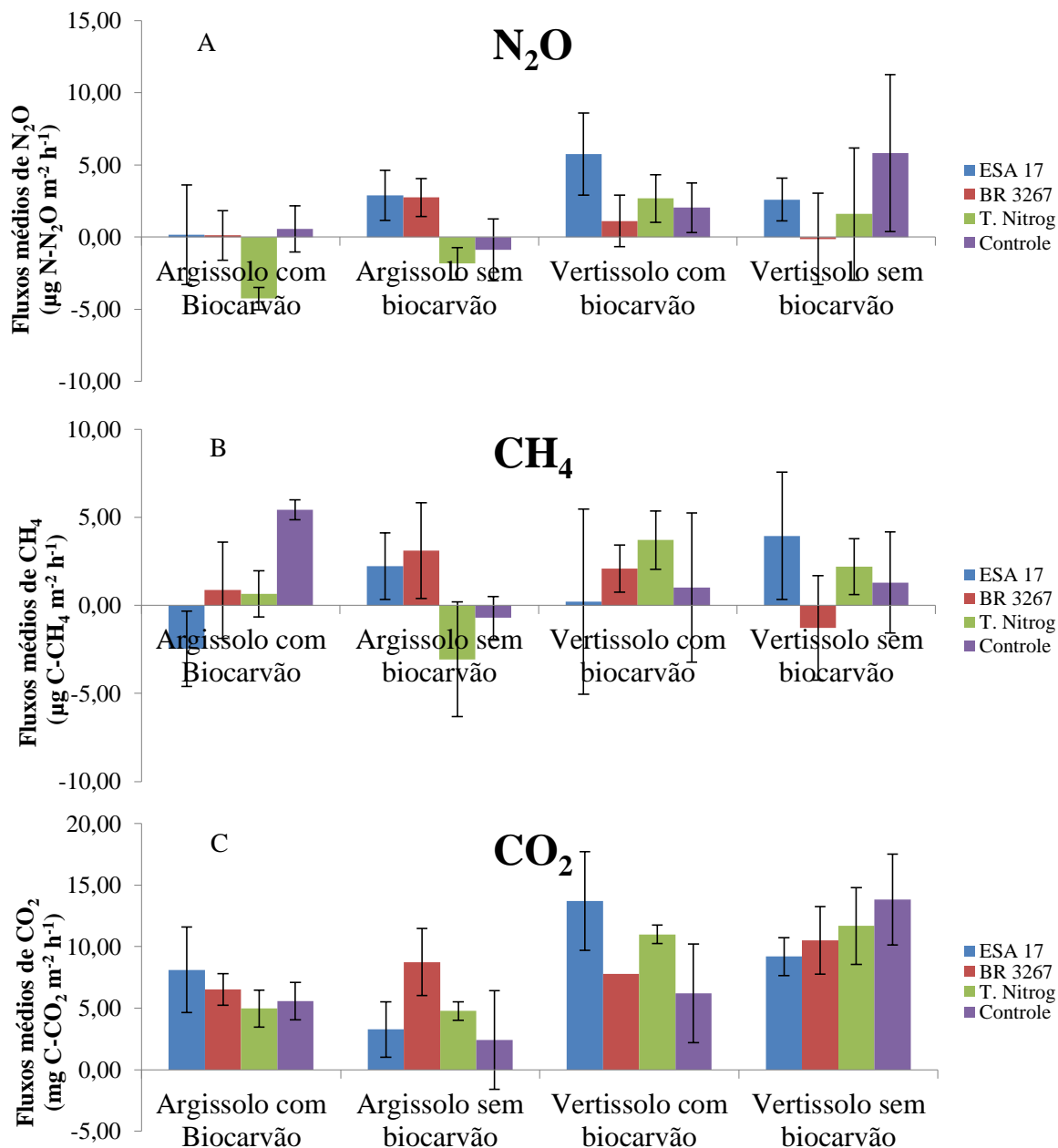
Tratamentos	Nitrogênio foliar (g/kg,planta <sup>-1</sup> )		Nitrogênio foliar (g/kg,planta <sup>-1</sup> )	
	Vertissolo		Argissolo	
	Com Biochar	Sem Biochar	Com Biochar	Sem Biochar
<b>ESA 17</b>	40,3 aA	39,4 aA	35,7 aA	38,0 aA
<b>BR 3267</b>	37,9 aA	35,1 aA	41,5 aA	43,1 aA
<b>N 80/ha<sup>-1</sup></b>	38,7 aA	38,8 aA	38,6 aA	34,8 aA
<b>Controle</b>	40,5 aA	41,8 aA	34,2 aA	40,1 aA
<b>CV(%)</b>	16,14		16,03	
<b>DMS</b>	12,44		12,10	

\*\*Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas linhas em uma mesma variável, e maiúsculas nas colunas, dentro das fontes nitrogenadas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## 5.2. EMISSÕES DE GEEs (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O E CH<sub>4</sub>) EM VASOS

A variabilidade dos dados foi muito elevada e só foi possível observar diferenças estatísticas entre solo e data de coleta para os fluxos de CO<sub>2</sub> do solo (Tabela 3). Em estudos sobre as emissões de GEEs do solo, é comum encontrar uma grande variabilidade nos resultados. Possivelmente, o aumento do número de repetições favoreceria a diferenciação entre os tratamentos, embora, em estudos sobre a dinâmica das emissões de GEEs pelo solo, o aumento do número de repetições de parcelas experimentais implique em uma quantidade muito maior de amostras para serem analisadas, o que aumentaria sobremaneira os custos da pesquisa.

Os maiores fluxos de CO<sub>2</sub> foram observados no Vertissolo (1,9 vezes superior ao do Argissolo), o que se justifica pelo maior teor de C presente nesse solo em comparação ao Argissolo (Figura 5 C). A maior disponibilidade de C no solo está associada a maiores fluxos de CO<sub>2</sub>, e o aumento das emissões de CO<sub>2</sub> está intrinsecamente ligado a decomposição da Matéria Orgânica do Solo - MOS e fatores físico-químicos e biológico, como temperatura, humidade e respiração pelas raízes das plantas, além da decomposição de resíduos orgânicos em ambientes agrícolas (BUYANOVSKY, 1986; REICOSKY & LINDSTROM, 1993; SÁ et al., 2001; GARNIER et al., 2003). Com relação aos dias de coleta, os maiores fluxos de CO<sub>2</sub> foram observados nos dias 06/12/2017 e 08/01/2018 (Tabela 6). Fatores climáticos podem ter forte influência sobre a atividade microbiana do solo. Dias nublados, assim como precipitação pode interferir na atividade metabólica dos micro-organismos e conseqüentemente sua participação nos processos de biogeoquímicos (CARDOSO et al., 1992; ASSIS-JUNIOR et al., 2003).



**Figura 5:** Fluxos de (A)  $CO_2$ , (B)  $CH_4$  e (C)  $N_2O$  no cultivo de feijão-caupi em função da aplicação de biocarvão e de diferentes fontes de N em Argissolo e Vertissolo. Erro-padrão da média (n=4).

Apesar da elevada variabilidade dos dados, no Argissolo, a aplicação de biocarvão apresentou uma tendência a reduzir os fluxos de  $CH_4$  quando aplicado junto com os inoculantes testados, demonstrando o potencial da combinação desses dois fatores para redução das emissões de GEEs (Figura 5B). No Argissolo, a aplicação de biocarvão com N mineral ou sem nenhuma fonte de N apresenta tendência de aumentar os fluxos de  $CH_4$  pelo solo, o que não ocorre no Vertissolo (Figura 5B). Possivelmente, no Argissolo, como

o teor de C é baixo, a adição desse elemento na forma de biocarvão estimulou a atividade dos micro-organismos metanogênicos do solo. Abujabhah et al., (2017), avaliando a influência do biochar sobre a comunidade microbiana, constatou um aumento considerável das comunidades metanotróficas, responsáveis pelos processos de transformação do metano no solo. Cabe ressaltar que, estes autores também trabalharam com vasos, porém, apenas com o “bulksoil”, ou seja, o solo sem o emprego de uma cultura agrícola.

**Tabela 6.** Comparação dos fluxos de CO<sub>2</sub> entre coletas

<b>Dia de coleta</b>	<b>Médias de fluxos de CO<sub>2</sub> g C-CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup></b>
22/11/2017	4,96±2,17 B
06/12/2017	13,35±1,77 A
27/12/2017	2,78±0,43 B
08/01/2018	10,98±1,07 A
<b>Comparação dos fluxos de CO<sub>2</sub> entre os solos</b>	
Argissolo	5,55±0,81 B
Vertissolo	10,49±1,34 A

\*\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) nas comparações dos dias de coletas e ( $p < 0,01$ ) para as comparações dos solos

Os fluxos de N<sub>2</sub>O tenderam a ser maiores no Vertissolo (Figura 5A), que naturalmente já contém maior disponibilidade de N que o Argissolo, favorecendo as reações de nitrificação e desnitrificação que levam à produção desse gás nos solos, seguindo os passos naturais do ciclo do N no solo. Contudo, não houve evidências estatísticas significativas dessa diferença no experimento, o que pode ser atribuído ao fato de ambos os solos terem sido peneirados antes do início do experimento, alterando assim a distribuição de agregados e de poros, fatores que afetam aeração e umidade e estão diretamente relacionados à formação e emissão de N<sub>2</sub>O no solo (Signor e Cerri, 2013). No Argissolo, os fluxos médios de N<sub>2</sub>O sugerem que a aplicação do biocarvão apresenta potencial para reduzir as emissões desse gás pelo solo. Os fluxos negativos de N<sub>2</sub>O nos tratamentos com adubação mineral do Argissolo, sem a adição de biocarvão, podem parecer contraditórios aos relatos da literatura. Entretanto, há que se levar em conta que esse experimento foi conduzido em vasos e que as plantas confinadas em vasos, na ausência de competição, podem ter sido mais eficientes em aproveitar N disponível no solo, reduzindo as perdas na forma de N<sub>2</sub>O, o que explicaria os fluxos negativos desse gás. No Vertissolo, como a disponibilidade de N no solo é naturalmente maior, os fluxos tendem a ser maiores e torna-se mais difícil verificar essa diferenciação em função do metabolismo das plantas.

Em função da elevada variabilidade dos dados, as emissões totais acumuladas ao longo do período experimental não foram diferentes entre os tratamentos avaliados (Tabela 7).

**Tabela 7.** Emissões totais acumuladas ao longo do experimento.

Solo	Biochar	Inoculante	N <sub>2</sub> O	E.P. da média	CH <sub>4</sub>	E.P. da média	CO <sub>2</sub>	E.P. da média
			mg N-N <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup>	mg N m <sup>-2</sup>	mg C-CH <sub>4</sub> m <sup>-2</sup>	mg C m <sup>-2</sup>	g C-CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup>	g C m <sup>-2</sup>
Argissolo	Com	ESA 17	0,82	3,44	-2,99	2,1	9,97	3,94
		BR 3267	1,8	2,13	4,3	2,11	7,45	1,63
		T. Nitrog	-5,48	1,93	0,87	2,79	4,59	1,09
		Testemunha	0,66	3,24	5,45	0,44	6,01	2,95
	Sem	ESA 17	1,93	1,74	2,47	1,98	2,79	2,43
		BR 3267	3,45	1,87	4,85	4,48	10,21	4,23
		T. Nitrog	-0,52	0,68	-4,1	4,28	6,47	0,76
		Testemunha	-2,25	4,15	-0,78	1,7	2,61	4,7
Vertissolo	Com	ESA 17	6,48	2,84	0,56	5,81	14,66	2,26
		BR 3267	0,85	2,64	1,99	1,47	9,83	3,35
		T. Nitrog	4,78	2,49	3,43	4,52	11,00	3,73
		Testemunha	3,18	2,75	4,68	2,87	12,38	2,18
	Sem	ESA 17	2,14	1,48	4,43	3,77	8,9	1,67
		BR 3267	-2,31	1,61	-0,45	3,32	9,25	3,33
		T. Nitrog	3,4	4,11	3,23	2,29	16,53	2,43
		Testemunha	4,3	6,55	2,2	4,57	13,33	7,7

### 5.3. ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO APÓS PLANTIO DE FEIJÃO-CAUPI INOCULADO.

Os resultados das análises físicas e químicas nos dois solos, mostras modificações expressivas quanto alguns parâmetros e nutrientes após 45 dias de cultivo do caupi.

Quanto às mudanças químicas, a Condutividade Elétrica (C.E.) diminuiu consideravelmente no Argissolo, mostrando teores mais elevados nos tratamentos onde foram aplicados os inoculantes e o carvão. Os teores de P diminuíram nesse solo para todos os tratamentos. Essa diminuição se deve ao fato do ensaio ter sido realizado em vasos, muito provavelmente, a planta consumiu grande parte do P disponível no recipiente o que explica a diminuição deste macronutriente no solo, o que mais chama atenção, quanto aos teores de P, é que no Vertissolo, teve seus níveis de P aumentados mais que o dobro em

todos os tratamentos, o carvão pode ter feito com que o fósforo não trocável, fixado à fração coloidal do solo tenha sido liberado, ficando disponível no solo. O Vertissolo, que apresenta teores de silte e argila bem maiores que o Argissolo, mais abundante na fração areia, possui um maior aporte de nutrientes ligado à fração coloidal que a medida que as características químico-físicas do solo se alteram, são liberados na solução do solo.

O que pode ter ocorrido nesse caso, não com o biocarvão, mas pela interferência das raízes do feijão no solo. A rizosfera é um habitat mutável, sua composição e estrutura mudam com o ciclo vegetativo, sendo a planta uma das maiores influenciadoras das mudanças nas características físicas e químicas do solo, o sistema radicular, possui o poder de enriquecer o solo com uma vasta quantidade de compostos orgânicos alterando fatores importantes como pH e os níveis de sais pela absorção seletiva de íons (PEREIRA et al. 2000).

**Tabela 8:** Resultados das análises químicas dos solos dos campos experimentais de Bebedouro (Argissolo) e Mandacarú (Vertissolo).

<b>Tratamento</b>	<b>C.E.</b>	<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Na</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>
<b>Argissolo</b>	<b>mS/cm<sup>-1</sup></b>		<b>mg/dm<sup>-3</sup></b>		<b>Cmol/dm<sup>-3</sup></b>			<b>mg/dm<sup>-3</sup></b>	
ESA 17 + <i>Biochar</i>	0,25	5,8	6,68	0,11	0,06	1,22	20,4	21,4	3,76
BR 3267 + <i>Biochar</i>	0,23	6,1	6,76	0,10	0,06	1,10	16,8	17,0	4,13
Cont. Nitr. + <i>Biochar</i>	0,16	5,5	4,67	0,07	0,04	0,96	15,7	16,8	1,98
Cont. abs + <i>Biochar</i>	0,19	5,9	4,88	0,09	0,05	0,96	21,2	21,3	1,07
ESA 17 - <i>Biochar</i>	0,14	5,6	5,82	0,09	0,05	1,53	22,8	21,9	1,26
BR 3267 - <i>Biochar</i>	0,16	5,9	5,39	0,10	0,04	0,85	15,6	18,4	1,06
Cont. Nitr. - <i>Biochar</i>	0,13	5,5	4,96	0,09	0,04	1,38	16,7	19,0	1,60
Cont. abs. - <i>Biochar</i>	0,12	5,9	5,89	0,09	0,02	1,07	20,4	20,8	1,37
<b>Vertissolo</b>	<b>mS/cm<sup>-1</sup></b>		<b>mg/dm<sup>-3</sup></b>		<b>Cmol/dm<sup>-3</sup></b>			<b>mg/dm<sup>-3</sup></b>	
ESA 17 + <i>Biochar</i>	0,53	7,4	14,46	0,40	0,18	1,07	9,7	60,3	0,96
BR 3267 + <i>Biochar</i>	0,48	7,4	12,66	0,36	0,18	1,48	10,6	55,8	1,35
Cont. Nitr. + <i>Biochar</i>	0,46	7,5	11,87	0,47	0,21	1,56	13,3	60,9	1,19
Cont. abs + <i>Biochar</i>	0,52	7,5	16,05	0,45	0,20	1,36	14,4	65,9	1,28
ESA 17 - <i>Biochar</i>	0,47	7,6	16,33	0,47	0,24	1,23	13,6	65,6	1,12
BR 3267 - <i>Biochar</i>	0,46	7,6	12,66	0,38	0,18	1,10	10,9	50,9	0,82
Cont. Nitr. - <i>Biochar</i>	0,49	7,6	17,27	0,34	0,18	1,30	12,7	65,8	1,00
Cont. abs. - <i>Biochar</i>	0,56	7,6	17,34	0,38	0,20	1,21	11,9	59,7	1,09

**Tabela 9:** Resultados das análises físicas dos solos dos campos experimentais de Bebedouro (Argissolo) e Mandacarú (Vertissolo).

<b>Tratamento</b>	<b>Densidade</b>		<b>Porosidade</b>	<b>Granulometria</b>		
	<b>Solo</b>	<b>Partículas</b>		<b>Areia</b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>
<b>Argissolo</b>	<b>(kg/dm<sup>3</sup>)</b>		<b>(%)</b>	<b>(g/kg)</b>		
ESA 17 + <i>Biochar</i>	1,32	2,52	47,56	796,1	152,1	51,8
BR 3267 + <i>Biochar</i>	1,31	2,50	47,70	781,3	162,1	56,6
Cont. Nitr. + <i>Biochar</i>	1,18	2,52	52,92	783,8	171,9	44,3



Cont. abs + <i>Biochar</i>	1,15	2,57	55,35	737,1	197,7	65,3
ESA 17 - <i>Biochar</i>	1,31	2,53	48,16	820,5	100,0	79,5
BR 3267 - <i>Biochar</i>	1,17	2,52	53,54	820,7	117,1	62,2
Cont. Nitr. - <i>Biochar</i>	1,24	2,55	51,29	838,4	101,0	60,7
Cont. abs. - <i>Biochar</i>	1,34	2,58	47,81	822,9	107,2	69,9
<b>Vertissolo</b>						
ESA 17 + <i>Biochar</i>	1,16	2,38	51,21	283,9	405,4	310,7
BR 3267 + <i>Biochar</i>	1,23	2,35	47,89	315,6	378,7	305,8
Cont. Nitr. + <i>Biochar</i>	1,18	2,51	52,88	332,1	338,8	329,1
Cont. abs + <i>Biochar</i>	1,15	2,41	52,41	316,2	333,8	350,0
ESA 17 - <i>Biochar</i>	1,24	2,50	50,27	290,0	363,4	346,6
BR 3267 - <i>Biochar</i>	1,16	2,53	54,37	293,1	357,5	349,4
Cont. Nitr. - <i>Biochar</i>	1,15	2,47	53,55	265,3	400,3	334,4
Cont. abs. - <i>Biochar</i>	1,23	2,44	49,70	292,2	345,9	361,9

Devido suas características particulares derivadas do material do qual o biochar é derivado, em determinados ambientes esse material pode promover alterações no pH (Kookana, et al., 2011, ABUJABHAN et al., 2016). Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com essa afirmação, os níveis de pH foram alterados (Tabela 8).

Além disso, teores de Nutrientes e granulometria também foram acometidos de mudança na presente pesquisa, ressaltando o auto potencial do biochar como condicionador de solos.

#### 5.4. EXPERIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Com o experimento para isolamento das bactérias, foram obtidos e estocados um total de 79 isolados divididos entre os dois solos com e sem aplicação do biochar (Tabela 10).

**Tabela 10:** relação de isolados obtidos em cada solo com e sem aplicação do biochar.

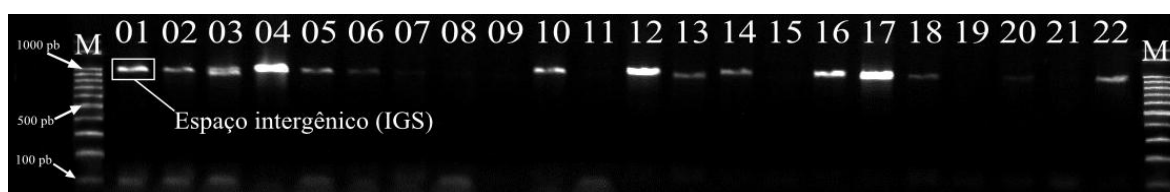
Repetições	Solos			
	Argissolo	Argissolo+C	Vertissolo	Vertissolo+C
<b>R1</b>	0	10	7	5
<b>R2</b>	9	9	6	5
<b>R3</b>	6	5	10	7
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>24</b>	<b>23</b>	<b>17</b>

\***Obs:** solo+C significa que houve aplicação do biochar

Nota-se uma alteração no número de bactérias obtidas de cada solo, para o Argissolo com a aplicação do carvão, o número de isolados se mostrou superior (24) ao número de isolados do mesmo solo sem a adição do material (15), é importante ressaltar que uma das parcelas desse solo, onde não aplicou-se o biochar, foi totalmente perdida por apresentar uma quantidade insignificante de nódulos.

### 5.5. IGS-RFLP COMO FERRAMENTA PRELIMINAR PARA SELEÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.

Após o isolamento e purificação dos isolados, o DNA bacteriano foi extraído e foi feita a amplificação do espaço intergênico IGS (Figura 6) para posterior digestão com as endonucleases *Hind* III, *Hin* 6I e *Alu* I (Figura 7).

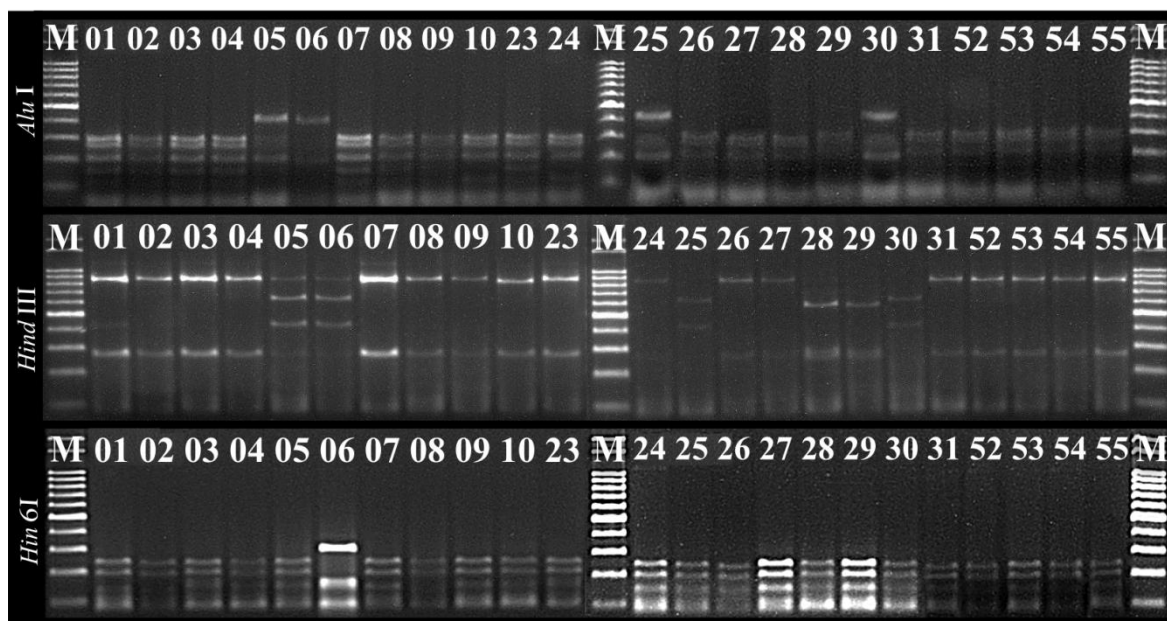


**Figura 6.** Amplificação do espaço intergênico-IGS (16S-23S rRNA) de alguns dos 72 isolados e estirpes representativas M = Marcador molecular (100 pb DNA ladder - Promega).

A restrição do IGS com as endonucleases mostrou padrões de bandas diferentes para as estirpes analisadas. Fernandes et al. (2003) fazendo uso do mesmo método, porém com a restrição do gene 16S rRNA e 5 enzimas de restrição, conseguiram separar e classificar estirpes dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* dos tabuleiros costeiros de Sergipe. Tampakaki et al. (2017), no entanto fazendo uso da técnica de RFLP, porém, com a restrição do gene 16S rRNA e IGS, constatou que esse primeiro gene separou todos os isolados em seu estudo em um único grupo de *Bradyrhizobium*, por outro lado, a comparação dos perfis de restrição gerados pelo IGS, dividiu esse grupo em dois grupos de filogenias distintas, sendo eles: *B. japonicum* e *B. elkanii*, o que indica que o IGS possui um poder discriminatório maior com agrupamento filogenético dos isolados de *Bradyrhizobium*.

Números variando de 2 a 4 fragmentos de DNA foram gerados pela restrição com as enzimas. Os resultados obtidos pela análise de restrição para os 72 isolados

representativos, foram empregados na construção do dendrograma de similaridade utilizando-se o coeficiente de Dice (Figura 8).



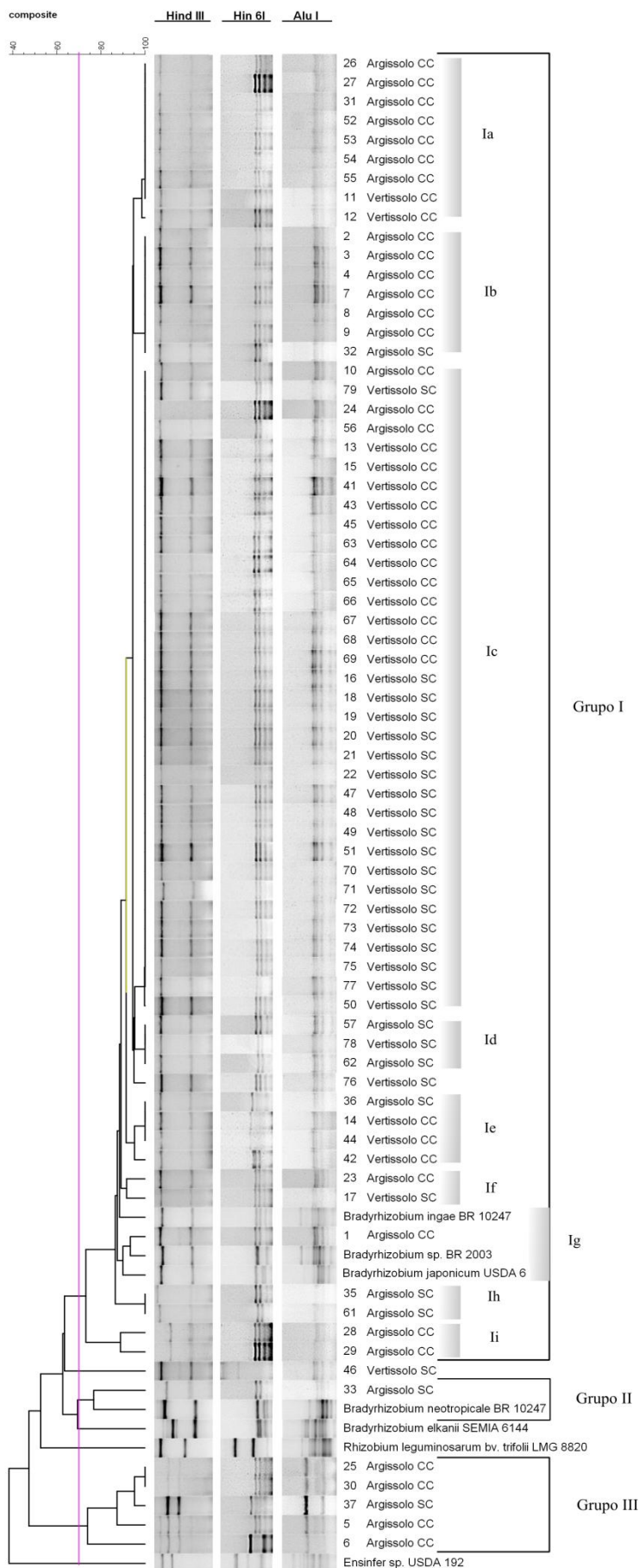
**Figura 7.** Digestão dos produtos de amplificação do espaço intergênico-IGS (16S-23S rRNA) de 23 isolados utilizando as endonucleases *Alu I*, *Hind III* e *Hin 6I*. M = Marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder).

A análise das imagens dos géis permitiu a geração de um dendrograma de similaridade que separou os isolados pelos solos de origem. Dentro destes grupos os isolados oriundos dos tratamentos com e sem aplicação de biochar, além da distribuição estirpes referenciais também avaliadas. Analisando o dendrograma de similaridade, é possível observar a formação de dois grupos principais, sendo um grupo menor representado por 5 isolados e outro representado pela maior parte dos isolados em estudo, um total de 67, além das estirpes de referência. Esses dois principais grupos apresentam entre si, uma similaridade em torno de 47% (Figura 8).

Fixando a similaridade em 70%, os diferentes perfis de restrição formaram três grupos (I, II e III). O grupo (I) representado pela maior parte das bactérias (65), apresentou uma similaridade de 73%, com vários subgrupos divididos em diferentes graus de similaridade esse maior grupo, se dividiu em 9 subgrupos (nomeados de Ia até Ii).

O subgrupo Ia, um dos maiores subgrupos do dendrograma, representado pelos isolados 28, 27, 31 52, 53, 54, 55, 11 e 12, teve a maior parte dos seus isolados componentes com similaridade de 100% aproximadamente, ressaltando-se apenas o isolado 12 com cerca de 98% de similaridade com os demais, cabe ressaltar sobre a origem

de cada um desses isolados: os isolados 28, 27, 31 52, 53, 54, 55, procedentes do Argissolo com aplicação de biochar, apresentaram 100% de similaridade com o componente 11 advindo do Vertissolo com carvão, e cerca de 98% com o isolado 12 originário também do Vertissolo com biochar.



**Figura 8.** Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS-RFLP digerido com as enzimas *Hin 6I*, *Hind III* e *Alu I* de isolados de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], obtidos de dois solos (Vertissolo e Argissolo) ambos do Vale do São Francisco. **Obs:** CC=Com biochar e SC=Sem biochar / Linha rosa demarca 70%.

Os isolados 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 32, todos originários do Argissolo e pertencente ao subgrupo Ib, apresentaram 100% de similaridade, porém, o isolado 32 foi isolada do Argissolo que não recebeu a adição de biochar.

O subgrupo Ic, representado pelo maior número de isolados no dendrograma (34 isolados), apresentou uma similaridade de 100%, desse total, 31 são de origem do Vertissolo, sendo eles: 16, 18, 19, 20, 21, 22, 47, 48, 49, 50, 51, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, e 79, provenientes do Vertissolo com biochar e, 13, 15, 41, 43, 45, 63,64, 65, 66, 67, 68, 69 do mesmo solo sem a adição do material. Apenas os isolados 10, 24 e 56 são de origem do Argissolo com a adição do carvão vegetal. Além de terem se agrupado em sua maioria junto as estirpes de referencia de *Bradyrhizobium ingae* BR 10247, *Bradyrhizobium* sp. BR 2003 e *B. japonicum* USDA6, uma grande quantidade de indivíduos obtidos no presente estudo podem ser enquadrados como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* por meio da técnica de IGS-RFLP. Cabe ressaltar que, o gênero *Bradyrhizobium* é o principal microsimbionte do feijão-caupi e que a obtenção de bactérias deste gênero em ensaios de isolamento de rizóbios do feijão-caupi ocorre com abundância (ZILLI et al., 2004; ZILLI et al., 2006, MOSQUEIRA et al. 2013).

No subgrupo Id, os isolados 57, 62, 78 e 76 dividiram-se entre os dois solos, os isolados 57 e 62 e 78, apresentaram uma similaridade de 100%, enquanto o indivíduo 76, proveniente do Argissolo sem adição de biochar juntamente com o isolado 78, apresentou uma similaridade de aproximadamente 90%. Os isolados 57 e 62, embora apresentando 100% de similaridade com o isolado 78, estes são provenientes do Vertissolo com e sem aplicação de biochar, respectivamente.

Os isolados 36, 14, 44 e 42 juntos em um mesmo subgrupo (Ie), foram originários dos dois solos em estudo. O isolado 36 é oriundo do Argissolo sem aplicação do biochar, apresentando em torno de 100% de similaridade com os isolados 14 e 44 que juntamente com o isolado 42, com uma menor similaridade, em torno de 96%, foram originários do Vertissolo com aplicação do biochar.

Os isolados 23 e 17 com aproximadamente 92% de similaridade entre si e agrupadas no subgrupo If, não são provenientes do mesmo solo, sendo o isolado 23 originário do Argissolo com aplicação do biochar, enquanto que o 17 é originário do Vertissolo sem aplicação do biochar. A estirpe referência *Bradyrhizobium ingae* BR 10247<sup>T</sup>, apresentou uma similaridade perto de 89% com estes dois isolados, no entanto, cabe ressaltar que essa estirpe se distanciou em outro clado.

O isolado 1 pertencente ao subgrupo Ig e proveniente do Argissolo com aplicação do biochar, agrupou-se junto às estirpes *Bradyrhizobium* sp. BR 2003 e BR 6144 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6 com similaridades em torno de 93% e 90%, respectivamente.

Os isolados 35 e 61 pertencentes ao subgrupo Ih, apresentaram similaridade de 100%, ambos provenientes do Argissolo sem a aplicação do biochar. O subgrupo Ii representado pelos isolados 28 e 29, provenientes do Argissolo com aplicação do biochar, foram os que mais se distanciaram dos demais componentes do grupo I, apresentando entre si, aproximadamente 90% de similaridade. O isolado 46, originário do Vertissolo sem a aplicação de biochar, não ficou dentro da linha de corte de 70%, apresentando uma similaridade em torno de 63% com o grupo I.

As estirpes *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 6144 e *Bradyrhizobium neotropicale* BR 10247 agruparam com a bactéria 33 proveniente do Argissolo sem aplicação do biochar, com respectivamente 69% e 76% de similaridade.

O grupo II, com 78% de similaridade, formado por dois representantes, traz o isolado 33 proveniente do Argissolo sem aplicação de carvão juntamente a estirpe tipo *Bradyrhizobium neotropicale* BR 10247. O grupo III, representado pelos isolados (5, 6, 25, 30 e 37) apresentou uma similaridade em torno de 74%. Neste grupo, todos os isolados foram provenientes do Argissolo, sendo apenas o isolado 37, oriundo do tratamento sem aplicação do biochar. O isolado 6, proveniente do Argissolo com aplicação desse material, foi o que apresentou o maior distanciamento dos demais (74%), enquanto os isolados 25 e 30 apresentaram 100% de similaridade, sendo provenientes do Argissolo com aplicação do biochar. Nesse grupo, não englobou nenhuma das estirpes tomadas como referências, no entanto, mesmo que distante, o isolado referencial *Ensifer* sp. USDA 192 apresentou uma similaridade de 40% com todos os isolados analisados neste estudo (OutGroup).

De acordo com o discutido acima é possível destacar a uniformidade entre os agrupamentos, que separaram os isolados de acordo com solo e com aplicação ou não de biochar, de todos os isolados obtidos nesse estudo, 39 foram isolados do Argissolo, e 40 deles são oriundos do Vertissolo. Entretanto, não se pode afirmar que o biochar tenha interferido no número de isolados obtidos por outro lado, foi observada um elevado número de isolados agrupando com *Bradyrhizobium* spp., indicando que de acordo com Abujabhah et al., (2017), o carvão interfere na dinâmica das comunidades bacterianas do solo, inclusive no grupo das FBNs.

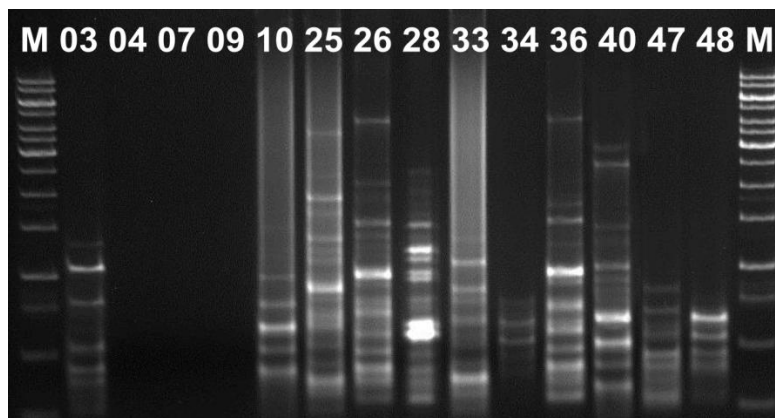
## 5.6. *FINGERPRINTING* PARA SEPARAÇÃO INTRAESPECÍFICA DOS ISOLADOS IGS-RFLP POR BOX-PCR

Tendo em vista que grande parte dos isolados apresentou 100% de similaridade no dendrograma gerado pelas imagens dos géis gerados a partir da digestão do amplicon 16S-IGS1-5.8S-IGS2-23S com as três endonucleases aplicadas, os isolados 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 26, 27, 27, 31, 32, 41, 43, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77 e 79, pertencentes aos maiores agrupamentos com 100% de similaridade foram avaliados quanto ao seu *fingerprinting* molecular por meio da técnica de BOX-PCR, utilizando-se o iniciador BOX-A1.

Avaliando os perfis gerados (Figura 9) é possível observar que há variabilidade entre os isolados obtidos, ou seja, que os isolados não apresentaram o mesmo perfil. Embora consiga separar indivíduos por gênero e espécie, a técnica de RFLP não é eficiente em classificar isolados dentro de uma mesma espécie, assim foi lançado mão, da técnica de BOX-PCR que consegue amplificar sequências repetitivas (rep-elements), do genoma bacteriano, confirmando se as bactérias identificadas como sendo 100% iguais no IGS-RFLP, não seriam diferentes.

O *fingerprinting* gerado pelos isolados foi utilizado na construção de um dendrograma de similaridade (Figura 10), onde foi possível separar os isolados. O dendrograma gerado formou um total de 9 grupos. Dos 48 isolados escolhidos, apenas 3 pares de isolados (8 e 56 provenientes do Argissolo com aplicação de biochar, 75 e 77 do Vertissolo sem aplicação do biochar e os isolados 68 e 16 do Vertissolo com e sem adição do biochar respectivamente) apresentaram 100% de similaridade, sendo considerados assim os mesmos isolados, sendo inclusive obtidos, ambos os pares, do mesmo solo. As bactérias. Tampakaki et al. (2007), utilizando a técnica de ERIC-PCR, agrupou uma coleção de 40 isolados gregos de rizóbios de feijão-caupi em apenas 7 grupos com similaridade de 100%, diferentemente do observado nas bactérias isoladas do Submédio do Vale do São Francisco no presente estudo, indicando a elevada variabilidade genética dos isolados obtidos.





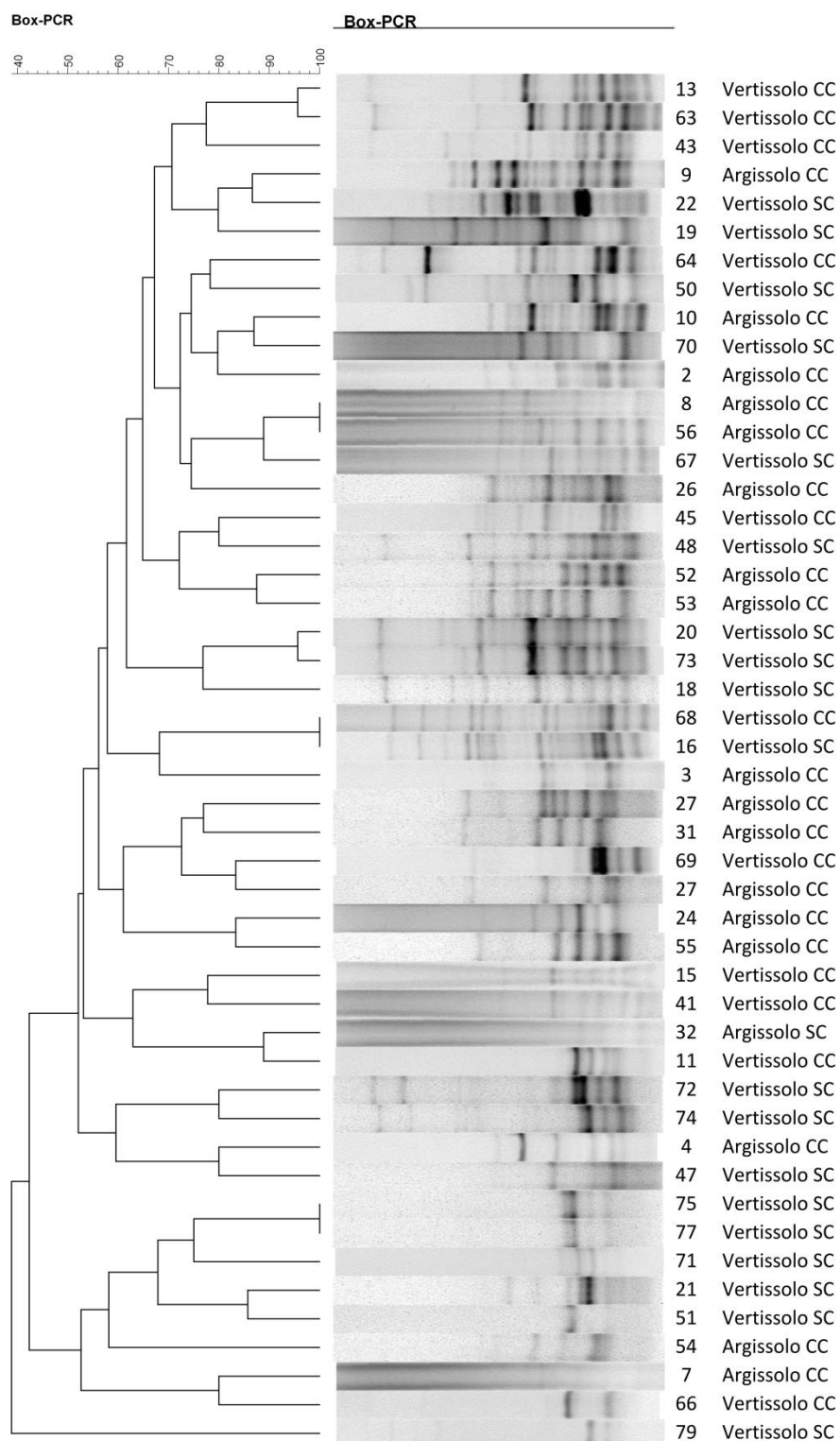
**Figura 9.** BOX-PCR de alguns dos isolados que apresentaram 100% de similaridade no IGS-RFLP.

É importante ressaltar que embora os 48 isolados submetidos ao BOX-PCR tenham agrupado com 100% de similaridade por meio da técnica de IGS-RFLP, e muitos terem sido obtidos do mesmo solo com ou sem aplicação do biochar, a técnica de BOX-PCR confirmou que esses isolados são diferentes mesmo que a nível intraespecífico. Dessa forma, poucos isolados, apenas os três pares com 100% de similaridade, podem ser considerados como estirpes que foram isoladas mais de uma vez no processo de obtenção das bactérias. Este dado reforça a grande diversidade da coleção obtida no presente estudo.

Straliozzo e Rumjanek (1999), abordam a eficácia do BOX-PCR como ferramenta molecular para separação de isolados ao nível intraespecífico. É possível observar uma grande diversidade entre os isolados, e também, que houve uma elevada variabilidade dos isolados independente do solo de onde foram capturados e/ou da aplicação de biochar.

De maneira geral, pode-se apontar um alto nível de diversidade intraespecífica entre os isolados avaliados neste estudo, tendo em vista que os grupos apontados como sendo do mesmo grupo no IGS-RFLP com 100% de similaridade, quando avaliados pelo BOX-PCR, separou os isolados mostrando serem em sua maioria diferentes uns dos outros. Dessa forma, as bactérias obtidas dos solos de Petrolina e Juazeiro podem até pertencer à mesma espécie (o que será determinado após avaliações moleculares mais detalhadas) mas são estirpes diferentes apresentando assim alto grau de variabilidade intraespecífica. Stocco et al. (2008) também encontraram dados semelhantes, em seu trabalho com diversidade de rizóbios em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em Santa Catarina, onde a variabilidade genética elevada foi observada em observada por meio dos perfis de BOX-PCR em bactérias classificadas como 100% similares pela técnica de ARDRA. Fernandes et al. (2003), associando um conjunto de ferramentas moleculares, também encontrou alta

diversidade entre os isolados de rizóbio de feijão-caupi e guandu, estes autores, enfatizam ainda o poder discriminatório do BOX-PCR , no entanto, deixam claro a necessidade de associá-lo a outras técnicas como ARDRA ou mesmo, IGS-RFLP. Com base nos resultados obtidos ficou clara a eficiência da técnica de BOX-PCR , como ferramenta para separação intraespecífica de isolados bacterianos, o que tem sido confirmado por vários autores (Laguerre et al., 1997, Mostasso et al., 2002; Fernandes et al., 2003).



**Figura 10. Dendrograma de similaridade obtido a partir de perfis gerados por meio do *fingerprinting* molecular de BOX-PCR obtidos para os 48 isolados selecionados por meio da técnica de IGS-RFLP. Os perfis obtidos foram analisados com o programa BioNumerics 7.5 utilizando o algoritmo UPGMA, o coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 2%.**

## 5.6. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR MEIO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO IGS

Após a triagem feita pelo IGS-RFLP e análise do *fingerprinting* gerado pelo Box-PCR, 30 isolados (12 do Argissolo e 18 do Vertissolo) considerados distintos nas duas técnicas foram selecionados para o sequenciamento do espaço intergênico. A partir dos resultados das reações de sequenciamento e análise da qualidade das sequências, 26 sequências que apresentaram qualidade e tamanho adequado (acima de 580 pb contínuos com QV>19) foram utilizadas para comparação com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI (GenBank).

As 26 bactérias identificadas se dividiram em dois gêneros, a grande maioria, um total de 23 isolados, foram classificados como *Bradyrhizobium*, sendo apenas 2 isolados classificados como *Microvirga* e 1 isolado como não apresentou identidade com gêneros de rizóbio, mas sim com a de uma  $\alpha$ -proteobacteria cuja sequência é originária de técnica independente de cultivo (Tabela 11).

O feijão-caupi assim como outras leguminosas é considerado com capacidade de nodular com ampla diversidade de rizóbios nativos dos solos tropicais (XAVIER et al., 2006;). Entretanto, os microssimbiontes preferenciais do feijão-caupi são aqueles do gênero *Bradyrhizobium*, obtido de forma majoritária. Na região semiárida do Brasil, há a abundância muito grande de isolados de *Bradyrhizobium* eficientes em feijão caupi, como a estirpe BR 3267, de *Bradyrhizobium yuanmingense*, utilizado como referência nesse estudo, originária de solos de Petrolina é recomendada pelo MAPA e recomendada como inoculante para feijão-caupi desde 2006 (MARTINS et al., 2003).

**Tabela 11.** Identificação dos isolados bacterianos de (*Vigna unguiculata*) dos dois solos (Vertissolo e Argissolo) “presença” e “ausência” de biochar, por meio da comparação das sequências parciais do espaço intergênico-IGS com as disponibilizadas pelo NCBI.

Isolado	Origem	Grupo RFLP	Melhor correspondência	Cobertura	Identidade /E-value	Código de acesso	pb
1	A+C	Ig	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10700	85%	100%	AJ279277.1	897
2	A+C	Ib	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10700	80%	100%	AJ279277.1	983
5	A+C	III	<i>Uncultured <math>\alpha</math>-proteobacterium clone P2F10</i>	73%	84%	GU195856.1	902
8	A+C	Ib	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10700	82%	100%	AJ279277.1	853
9	A+C	Ib	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10700	84%	100%	AJ279277.1	833
12	V+C	Ia	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU <sup>T</sup>	82%	99%	AY386734.1	761
13	V+C	Ic	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	83%	99%	AY386734.1	848
16	V-C	Ic	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	79%	99%	AY386734.1	961
23	A+C	If	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10700	82%	99%	AJ279277.1	860
27	A+C	Ia	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3650	87%	98%	JN085458.1	935
29	A+C	Ii	<i>Bradyrhizobium subterraneum</i> 58 2-1 <sup>T</sup>	79%	96%	KM378539.1	932
30	A+C	III	<i>Microvirga ossetica</i> V5/3M <sup>T</sup>	87%	86%	CP016616.1	939
31	A+C	Ia	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10700	85%	99%	AJ279277.1	841
35	A-C	Ih	<i>Bradyrhizobium subterraneum</i> 58 2-1 <sup>T</sup>	72%	98%	KM378539.1	941
36	A-C	Ie	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	83%	99%	KU724154.1	900
37	A-C	III	<i>Microvirga ossetica</i> V5/3M <sup>T</sup>	87%	87%	CP016616.1	894
45	V+C	Ic	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	79%	99%	AY386734.1	961
46	V-C	I	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	83%	99%	AY386734.1	914
49	V-C	Ic	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	82%	99%	AY386734.1	885
53	A+C	Ia	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3650	86%	99%	JN085458.1	890
56	A+C	Ic	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10700	85%	99%	AJ279277.1	837
57	A-C	Id	<i>Bradyrhizobium vignae</i> 7-2 <sup>T</sup>	79%	100%	KM378504.1	986
63	V+C	Ic	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10700	92%	99%	AJ279277.1	812
64	V+C	Ic	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	82%	99%	AY386734.1	925
65	V+C	Ic	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	84%	98%	AY386734.1	866
68	V+C	Ic	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	82%	99%	KU724154.1	856

\*Obs: A+C = Argissolo com biochar; A-C = Argissolo sem biochar; V+C = Vertissolo com biochar; V-C = Vertissolo sem biochar

Embora 23 dos 26 isolados tenham sido classificados como sendo do gênero *Bradyrhizobium*, esse grande grupo apresentou identidade com três espécies de *Bradyrhizobium* diferentes. O maior desses grupos representado pelos isolados (13, 16, 36, 45, 46, 49, 64, 65 e 68), apresentaram identidade de 99% (exceto o isolado 65 com 98%) com *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071<sup>T</sup>. Oito desses isolados foram provenientes do Vertissolo, sendo (13, 45, 64, 65 e 68) do solo com carvão e (16, 46 e 49), do solo sem carvão. O isolado 36 foi proveniente do Argissolo sem adição do material. O segundo maior grupo de *Bradyrhizobium*, foi representado por 10 isolados, sendo 9 deles (1, 2, 8, 9, 23, 27, 31, 53 e 56) do Argissolo com aplicação do biochar e, apenas o isolado (63) do Vertissolo com o biochar. Embora todos tenham sido classificados com *Bradyrhizobium* sp., cabe salientar que os isolados (27 e 53), com 98% e 99% de Identidade respectivamente, foram classificados como *Bradyrhizobium* sp. ORS 3650, enquanto que os demais isolados (1, 2, 8 e 9) e (23, 31, 53 e 56), com 100% e 90% de identidade com *Bradyrhizobium* sp. LMG 10700, ou seja, apresentaram similaridade com estirpes diferentes, porém ambas do clado *B. japonicum*.

Os isolados (29) originário do Argissolo com aplicação do biochar e (35) de origem desse mesmo solo, porém sem aplicação desse material, apresentaram identidade de 96% e 98% de identidade com *Bradyrhizobium subterraneum* 58 2-1<sup>T</sup>. O isolado 57, do Argissolo com aplicação do carvão, apresentou 100% de identidade com a estirpe *Bradyrhizobium vignae* 7-2<sup>T</sup>.

Provenientes do Argissolo com e sem aplicação do biochar, respectivamente, os isolados (30 e 37), foram 86% e 87% similares à estirpe *Microvirga ossetica* V5/3M<sup>T</sup>. Por fim, o isolado 5 do Argissolo com aplicação do biochar apresentou 84% de identidade com uma sequência de origem ambiental de  $\alpha$ -proteobacteria (clone P2F10) obtida por meio de técnica independente de cultivo.

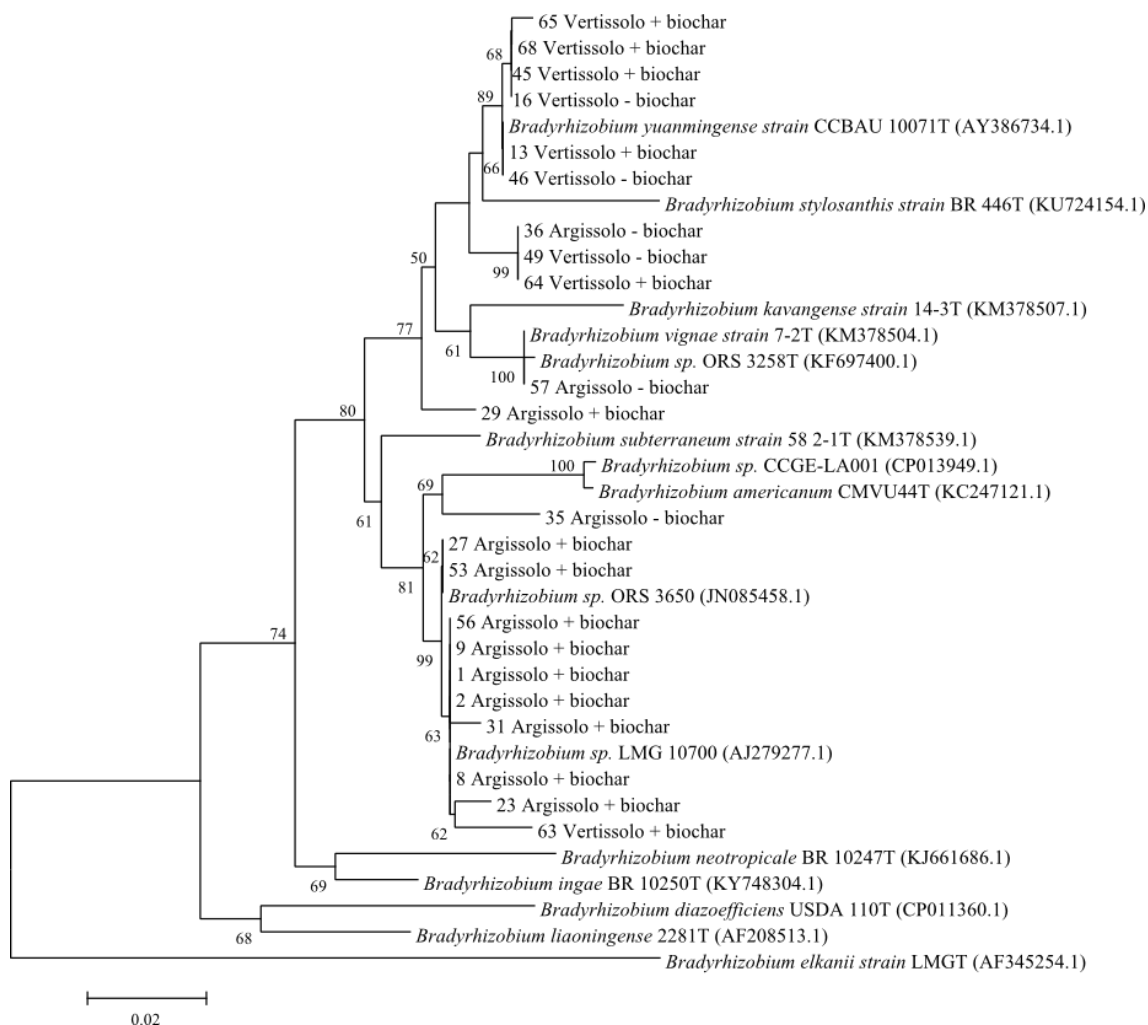
Os dados obtidos no presente estudo indicam não haver influência da aplicação do biochar na diversidade rizobianas nodulando feijão-caupi nos dois solos estudados, uma vez que o agrupamento do IGS-RFLP agrupou os isolados por solo e não por tratamento de aplicação de biochar.

Dentro dos resultados do sequenciamento (Tabela 8), o subgrupo I (Figura 8) mostrou identidade com as cepas *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071<sup>T</sup>, *Bradyrhizobium vignae* 7-2<sup>T</sup>, *Bradyrhizobium* sp. LMG 10700, *Bradyrhizobium* sp. ORS 3650 e *Bradyrhizobium subterraneum strain* 58 2-1<sup>T</sup>, de acordo com as sequências

disponíveis no GenBank. Com base nesse subgrupo, é possível afirmar que o IGS mostrou poder discriminatório entre espécies estritamente relacionados como *Bradyrhizobium* sp. ORS subgrupo Ia (isolados 27 e 53) e *Bradyrhizobium* sp. LMG 10700 subgrupo Ib (isolados 2, 8, e 9), dividindo-os em clados diferentes, mesmo com um nível de separação baixo como pode ser observado entre os subgrupos formados no grupo I. Todos os isolados do subgrupo Ia, exceto o 12 com menor similaridade entre os demais e caracterizado como *B. yuanmingense*, foram caracterizados como *Bradyrhizobium* sp. o que só confirma o poder discriminatório do IGS-RFLP.

Objetivando comparar a similaridade dos isolados classificados como *Bradyrhizobium* com as sequências pertencentes às estirpes tipo armazenadas no GenBank, foi construída uma árvore filogenética (Figura 11). O isolado 12, classificado como *Bradyrhizobium* e apresentado na (Tabela 11), não foi incluído na árvore, tendo em vista o tamanho de sua sequência ser pequena, e sua integração requereria o corte de outras sequências que apresentaram boa qualidade.

Os resultados mostrados na árvore corroboram com os gerados pela restrição do IGS, a proximidade dos isolados *Bradyrhizobium* sp. ORS 3650 e *B. sp* LMG 1070, confirmam a alta similaridade entre estas estirpes de de *Bradyrhizobium*.

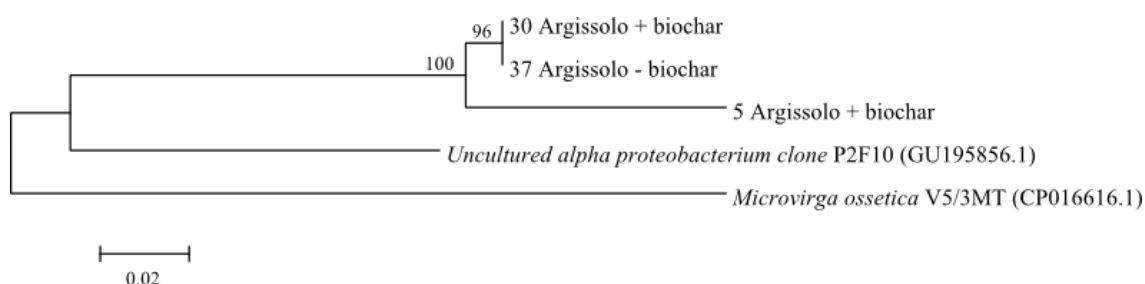


**Figura 11.** Árvore filogenética com base nas seqüências IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados bacterianos do feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbour-Joining Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados.

Por ser um gênero de rizóbio diferente dos demais em termos evolutivos, a concatenação das sequências na mesma árvore causou uma elevada quantidade de “gaps” nas sequências alinhadas, o que diminuiu muito o tamanho do alinhamento final. Por este motivo, foi criada uma outra árvore filogenética para os isolados classificados como *Microvirga* e para aquele com identidade à seqüência de origem ambiental (Figura 12). Nesse agrupamento, foi acrescentado novamente o isolado (5) juntamente com os isolados (30 e 37). O aparecimento de *Microvirgas* nesse trabalho ressalta a variabilidade genética dos rizóbios dos solos do Vale do São Francisco, e devem ser investigadas além desse trabalho para determinação e conhecimento de seu potencial simbiótico e agrônômico. Cabe ressaltar ao estirpe BR 3299<sup>T</sup> é a estirpe tipo de *Microvirga vignae*, uma nova espécie descrita recentemente (RADL et al., 2014) e



que apresenta um potencial agrônômico satisfatório quando comparado com inoculantes comerciais já bastante conhecido e indicados para caupi como o BR 3267 do Brasil (MARINHO et al., 2014). Radl et al. (2014), avaliando a filogenia de *Microvirga* originárias de solos do Nordeste, levanta a hipótese desses indivíduos terem obtido os genes responsáveis pela fixação de N, por meio da transferência horizontal, ressaltando que espécies pertencentes a esse mesmo gênero como *Microvirga lotononidis*, *Microvirga zambiensis* e *Microvirga lupini*, se destacam por características fenotípicas diversas.



**Figura 12.** Árvore filogenética com base nas sequências IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados bacterianos do feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbour-Joining Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados.

As divisões dos agrupamentos de isolados por solo indicam a alta variabilidade rizobiana de feijão-caupi nos solos do Submédio do Vale do São Francisco, conforme já descrito anteriormente (Leite et al., 2009; Marinho et al., 2017). Cabe ressaltar que as coletas dos solos foram realizadas em campos experimentais distantes em torno de 45 km um do outro. A variabilidade genética das bactérias localizadas em locais tão próximos reforça os resultados já obtidos previamente onde a diversidade de rizóbio na região é considerada elevada. Foi constatado também a obtenção de alguns exemplares com 100% de identidade e oriundos de solos distintos. O mesmo também foi descrito por Jaiswal et al, (2017) avaliando a diversidade de bactérias de amendoim na África do Sul e por Tampakaki et al. (2017) avaliando a diversidade de rizóbios de feijão-caupi na Grécia. Essas dados que ressaltam a hipótese de haver elevada diversidade em solos tropicais, porém com algumas *taxa* com ampla distribuição.

## 5.7. EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS DE FEIJÃO-CAUPI OBTIDOS DE DOIS SOLOS DO VALE DO SÃO FRANCISCO.

Os isolados escolhidos através da triagem pela comparação dos perfis gerados através das técnicas de IGS-RFLP e BOX-PCR, foram testados em casa de vegetação em um experimento com condições estéreis. A ausência de nódulos nos tratamentos não inoculados, tanto nas plantas que receberam como aquelas que não receberam N mineral indica que não houve contaminação e que os nódulos formados nos tratamentos inoculados foram induzidos pelas bactérias em estudo.

Todos os isolados avaliados nos ensaios foram capazes de estabelecer relação simbiótica eficiente com as plantas de feijão-caupi, avaliado por meio da formação de nódulos e pelo acúmulo de nitrogênio na planta, o que pode ser constatado quando comparados às testemunhas absolutas (livre de inoculação e adubação nitrogenada). As médias dos valores de massa das partes aéreas (MPAS) raízes (MRS) e nódulos secos (MNS), bem como o número de nódulos (NN), além do N total na parte aérea (N total) e a eficiência nodular foram submetidos a análise de variância e ao teste de ranqueamento de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 12).

Os isolados 1, 2, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 27, 30, 31, 35, 36, 37, 42, 43, 46, 49, 53, 56, 63, 64, 68, 75, 76, foram capazes de promover o maior acúmulo de MPAS, equiparando-se a testemunha nitrogenada, esses isolados se ainda destacaram quando confrontados com a estirpe de referência BR 3267 e a testemunha absoluta, sem nenhuma fonte de N. Não houve diferença estatística entre nenhum dos isolados para a variável MRS, embora a testemunha nitrogenada, juntamente com os isolados 10 e 12 tenham apresentado as maiores médias para essa variável. O acúmulo de MSPA indica por si só, que há interação simbiótica ocorrendo entre o isolado e a planta, isso leva a necessidade de mais testes, principalmente em campo, no intuito de selecionar inoculantes com um bom potencial agrícola. No mais, altos valores de MPAS representa um valioso indicativo do estado nutricional da planta, que pode indicar o potencial produtivo (XAVIER et al., 2006; SOUZA et al., 2008; ANTUNES et al., 2011).

Para a variável NN, os isolados 1, 2, 5, 8, 9, 12, 13, 16, 23, 27, 30, 31, 35, 37, 42, 45, 46, 53, 56, 57, 63, 64, 68, 75, 76 apresentaram as maiores médias se destacando em relação aos isolados 10, 36, 43 e 49 e também à referência BR 3267, entretanto a referência apresentou uma média superior aos isolados 36 e 49. Para a MNS não houve

diferença significativa entre nenhum dos isolados. Cabe ressaltar, que mesmo os resultados não tendo apresentado grande expressividade quanto as diferenças estatísticas, os valores mostraram-se sempre superiores a testemunha absoluta (zero). A testemunha nitrogenada que recebeu uma aplicação de N equivalente a dosagem de 80 kg/ha<sup>-1</sup> de N, ficou na mesma faixa de grande parte dos isolados, alguns até mostrando-se superiores como acontece na MPAS e no NTOT. Quanto a testemunha absoluta, assim como esperado, a mesma se mostrou inferior em todas as variáveis, o que corrobora a eficiência simbiótica dos isolados aqui testados. Variáveis como NN, MNS e também o tamanho de nódulos, constitui uma série de parâmetros de avaliação da simbiose entre bactéria e leguminosa, funcionando como critérios para avaliação da eficiência agrônômica de estirpes no Brasil (FERREIRA e CASTRO, 1995; ANTUNES et al., 2011).

**Tabela 12:** produção de massa da parte aérea seca (MPAS), massa da raiz seca (MRS), Massa de nódulos secos (MNS), Número de nódulos (NN), Nitrogênio total na parte aérea (NTOT) e Eficiência nodular (E.N.).

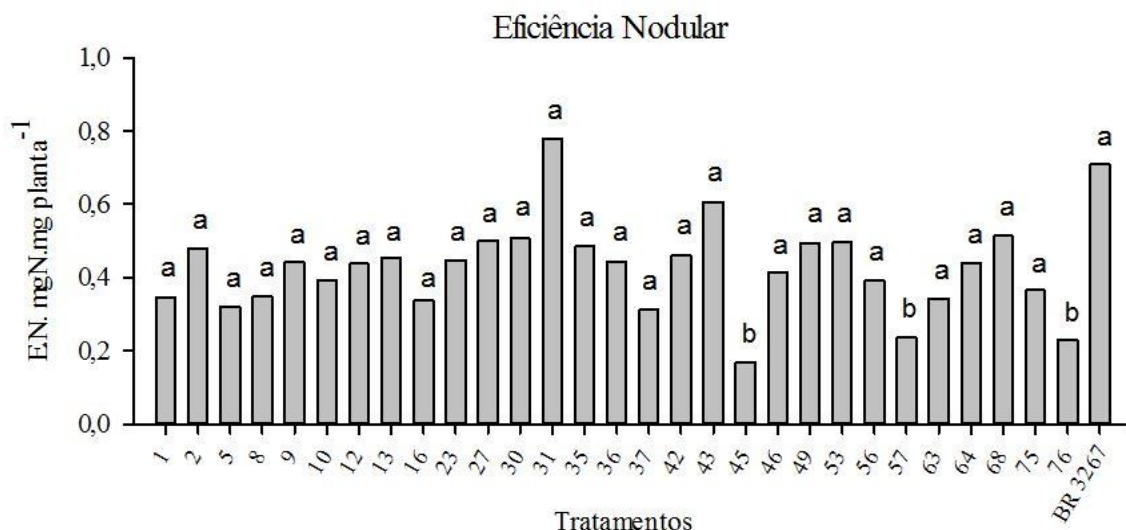
<b>Tratamento</b>	<b>MPAS g.planta<sup>-1</sup></b>	<b>MRS g.planta<sup>-1</sup></b>	<b>NN Nódulos. planta<sup>-1</sup></b>	<b>MNS g.planta<sup>-1</sup></b>	<b>NTOT mgN. planta<sup>-1</sup></b>
<b>1</b>	1,47 a	1,59 a	131 a	0,255 a	87,90 a
<b>2</b>	1,78 a	1,16 a	92 a	0,203 a	96,09 a
<b>5</b>	1,17 a	1,33 a	134 a	0,198 a	60,68 a
<b>8</b>	1,22 a	1,26 a	118 a	0,198 a	65,46 a
<b>9</b>	1,25 a	0,90 a	124 a	0,220 a	70,45 a
<b>10</b>	1,18 a	0,67 a	81 b	0,165 a	63,27 a
<b>12</b>	1,23 a	1,76 a	137 a	0,163 a	69,32 a
<b>13</b>	1,38 a	1,42 a	98 a	0,183 a	73,96 a
<b>16</b>	1,40 a	1,31 a	158 a	0,243 a	77,45 a
<b>23</b>	0,95 b	0,66 a	93 a	0,128 a	56,40 a
<b>27</b>	1,81 a	1,69 a	138 a	0,203 a	96,15 a
<b>30</b>	1,32 a	1,43 a	98 a	0,145 a	71,56 a
<b>31</b>	1,44 a	0,97 a	106 a	0,153 a	78,92 a
<b>35</b>	1,78 a	1,46 a	101 a	0,220 a	102,46 a
<b>36</b>	1,43 a	1,47 a	52 b	0,160 a	93,52 a
<b>37</b>	1,65 a	1,33 a	163 a	0,290 a	88,33 a
<b>42</b>	1,63 a	0,88 a	117 a	0,188 a	81,15 a
<b>43</b>	1,75 a	1,27 a	76 b	0,170 a	97,84 a
<b>45</b>	0,78 b	0,95 a	141 a	0,210 a	32,13 b
<b>46</b>	1,37 a	1,02 a	105 a	0,210 a	77,22 a
<b>49</b>	1,26 a	0,81 a	59 b	0,140 a	69,88 a
<b>53</b>	1,44 a	0,99 a	107 a	0,188 a	81,08 a
<b>56</b>	1,39 a	0,92 a	120 a	0,223 a	80,84 a
<b>57</b>	1,07 b	0,96 a	120 a	0,220 a	51,94 a
<b>63</b>	1,54 a	1,24 a	110 a	0,267 a	80,97 a

<b>64</b>	1,73 a	1,07 a	131 a	0,245 a	95,89 a
<b>68</b>	1,67 a	0,83 a	110 a	0,190 a	95,80 a
<b>75</b>	1,26 a	0,99 a	115 a	0,200 a	73,16 a
<b>76</b>	1,22 a	1,50 a	135 a	0,320 a	68,61 a
<b>BR 3267</b>	0,78 b	1,13 a	70 a	0,153 a	32,43 b
<b>Test Nitr</b>	1,29 a	1,66 a	0 c	0 b	51,65 a
<b>Test Abs</b>	0,64 b	0,97 a	0 c	0 b	10,51 c
<b>CV%</b>	8,83	22,18	22,84	3,24	17,50

\*\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Quanto ao N total na parte aérea, todos os inóculos, exceto o isolado 45 e a BR 3267, foram capazes de fixar os maiores teores de nitrogênio nas plantas, mostrando-se estatisticamente superiores à testemunha nitrogenada, como esperado a testemunha absoluta apresentou o menor resultado. Resultados semelhantes foram encontrados por Melo e Zilli (2009) avaliando novas estirpes de rizóbio para feijão caupi no estado de Roraima.

Em relação à eficiência nodular (Figura 13), houve diferença significativa entre os isolados. Os isolados 1, 2, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 23, 27, 30, 31, 35, 36, 37, 42, 43, 46, 49, 53, 56, 63, 64, 68, 75 e a estirpe BR 3267 mostraram as melhores médias, contraposto as estirpes 45, 57 e 76 com os menores resultados em mg de N fixado por mg de nódulo, os resultados para eficiência nodular apontam a eficiência simbiótica dos isolados e podem indicar a eficácia da simbiose no acúmulo de N na parte aérea (MARINHO et al., 2017). Cabe ressaltar que a estirpe 31 e a BR 3267, se mostraram mais eficientes quanto ao processo de fixação de N. Melo e Zilli (2009), estudando a eficiência simbiótica da BR 3267 em campo e em casa de vegetação, ressalta a capacidade de fixação de N por parte dessa estirpe nesse ambiente controlado. Assim, é possível afirmar a grande capacidade de fixação de N por parte do isolado 31 (oriunda do Argissolo e com biochar) testado neste ensaio, tendo em vista este isolado ter apresentado uma média superior a BR 3267.



**Figura 13.** Eficiência nodular de 29 isolados bacterianos de nódulos de feijão-caupi cultivado em dois solos do vale do São Francisco + estirpe referência BR 3267. (Scot-Knott; 5% / CV%; 8,04). Média de 4 repetições.

A escolha de isolados bacterianos eficientes em fixação de N é de suma importância para a fabricação de inoculantes que possam suprir o requerido de N durante o ciclo de culturas como o feijão-caupi. Lacerda et al. (2004) ressalta a importância da busca por estirpes que possam ser eficientes no fornecimento de N, mas também que possa estabelecer a relação simbiótica com cultivares específicas, garantindo assim uma melhor empregabilidade e eficácia do inoculante.

MPAS, NN, MNS e NTOT, são atualmente considerados parâmetros mínimos para avaliação da FBN em leguminosas, definidos por Souza et al. (2008), para a cultura da soja, esses parâmetros podem ser aplicados para as demais leguminosas de valor agrícola.

Das estirpes avaliadas, todas aquelas que apresentaram elevada eficiência simbiótica foram oriundas dos dois solos estudados tanto com como sem a aplicação do biochar. Cabe ressaltar que, as estirpes de feijão caupi obtidas neste estudo corroboram com trabalhos anteriores que mostram uma elevada biodiversidade (Leite et al., 2009) e alta eficiência simbiótica (Martins et al., 2003; Marinho et al., 2017) de rizóbios de solos do Sertão do São Francisco foi demonstrada. Reforçando que estes solos podem ser repositórios de bactérias eficientes na FBN do feijão-caupi.

## 6. CONCLUSÃO

As alterações no número de nódulos e massa de nódulos secos, assim como a leve diferença visual dos números para massa da massa da parte aérea seca, são indícios de que a aplicação do biochar tem influência sobre o desenvolvimento fisiológico da planta de feijão-caupi, e que são necessários mais estudos utilizando outras doses de biochar, para se determinar qual a melhor dose desse material no desenvolvimento dessa cultura com a aplicação de inoculantes nesses dois solos.

A inconsistência nos resultados relacionado a alta variabilidade dos dados, impediu que se estimasse com segurança as emissões de GEE nesse ensaio. No entanto pode-se afirmar que o Vertissolo emitiu mais CO<sub>2</sub> que o Argissolo, e que relacionado as emissões de CH<sub>4</sub>, houve uma redução nas emissões desse gás neste solo.

Os fluxos médios de N<sub>2</sub>O, sugerem que o biocarvão apresenta potencial para redução das emissões desse gás neste solo.

A aplicação de biochar alterou os valores da condutividade elétrica e os teores de pH e nutrientes no solo, assim como características físicas como granulometria, se mostrando ser um eficiente condicionador de solos.

Foram identificadas ao todo dois gêneros capazes de nodular o caupi, o surgimento da *Microvirga ossetica* indica a alta variabilidade genética de rizóbios dos solos do Vale do São Francisco e sua baixa identidade com as espécies do mesmo gênero disponíveis no GenBank indicando que pode se tratar de um espécie não descrita ainda.

Os isolados testados sob condições de casa de vegetação não mostraram diferenças significativas nos parâmetros avaliados de massa da parte aérea seca, número de nódulos, N total e Eficiência Nodular, equiparando-se em alguns casos a referência e a testemunha nitrogenada o que indica potencial agrícola, que deve ser submetido a testes em campo.

Os resultados para emissões de GEEs obtidos nesse ensaio requerem maiores apurações para melhor elucidação dos efeitos do biochar sobre esses fatores, os isolados capturados nessa pesquisa, devem ser testados em outras etapas para garantir possíveis escolhas para inoculantes no futuro.

## 7. REFERÊNCIAS

ABUJABHAH, I. S.; DOYLE, R. B.; BOUND, S. A.; BOWMAN, J. P.; Assessment of bacterial community composition, methanotrophic and nitrogen-cycling bacteria in three soils with different biochar application rates. *Journal of Soils and Sediments*, Berlin, v. 18, n. 1, p. 148-158, 2017.

ABUJABHAH, I. S.; DOYLE, R.; BOUND, S. A.; BOWMAN, J. P. The effect of biochar loading rates on soil fertility, soil biomass, potential nitrification, and soil community metabolic profiles in three different soils. *Journal of Soils and Sediments*, Berlin, v. 16, n. 9, p. 2211–2222, 2016.

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

ARAÚJO, J. P. P.; RIOS, G. P.; WATT, E. E.; NEVES, B. P.; FAGERIA, N. K.; OLIVEIRA I. P.; GUIMARÃES, C. M.; SILVEIRA-FILHO, A. Cultura do Caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp; descrição e recomendações técnicas de cultivo. EMBRAPA, Circular Técnica. p.18-82, 1984.

ARGAW, A.; MULETA, D. Effect of genotypes-*Rhizobium*-environment interaction on nodulation and productivity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in eastern Ethiopia. *Environmental Systems Research*. v. 6, n. 14, p. 16, 2017.

ASSIS-JÚNIOR, S.L.; ZANUNCIO, J.C.; KASUYA, M.C.M.; COUTO, L.; MELIDO, R.C.N. Atividade microbiana do solo em sistemas agroflorestais, monocultura, mata natural e área desmatada. *Revista Árvore*, v. 27, n. 1, p. 35-41, 2003.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, v. 384, n. 1–2, p. 413–431, 2014.

BAUMANN, V. U.; SCHREIBER, H.; TESSMAR, K. IR-spektroskopische untersuchungen zur taktizität von polymethylmethacrylat. *Macromolecular Chemistry and Physics*. v. 36, n. 1, p. 81-85, 1960.

BERGLUND, L.M.; DELUCA, T.H.; ZACKRISSON, O. Activated carbon amendments to soil alters nitrification rates in Scots pine forests. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 36, n. 12, p. 2067-2073, 2004.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. *Bragantia*, Campinas, v. 70, n. 1, p. 206-215, 2011.

BUTNAN, S.; DEENIK, J. L.; TOOMSAN, B.; ANTAL, M. J.; VITYAKON, P. Biochar characteristics and application rates affecting corn growth and properties of soils contrasting in texture and mineralogy. *Geoderma*, v. 237-238, p. 105 – 116, 2015.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Campinas. p. 231-242. 1992.

CARMO, H. F. ; SILVA, M. A. S. ; MADARI, B. E. **Utilização de biochar como adionador de carbono no solo e seus efeitos químicos nas propriedades do solo sob feijoeiro comum no cerrado brasileiro**. In: II Workshop Internacional sobre Clima e Recursos Naturais nos Países de Língua Portuguesa, 2010, Bragança - Portugal. p. 159-165.

CAYUELA, M. L.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; HANLEY, K.; ENDERS, A.; LEHMANN, J. Biochar and denitrification in soils: when, how much and why does biochar reduce N<sub>2</sub>O emissions? *Scientific Reports*. v. 3, 1732. 2013.

CORDEIRO, L. A. M.; ASSAD, E. D.; FRANCHINI, J. C.; SA, J. C. M.; LANDERS, J. N.; AMADO, T. J. C.; RODRIGUES, R. A. R.; ROLOFF, G.; BLEY-JUNIOR, C.; ALMEIDA, H. G.; MOZZER, G. B.; BALBINO, L. C.; GALERANI, P. R.; EVANGELISTA, B. A.; PELLEGRINO, G. Q.; MENDES, T. A.; AMARAL, D. D.; RAMOS, E.; MELLO, I.; RALISCH, R. *O Aquecimento Global e a Agricultura de Baixa Emissão de Carbono*. Brasília: MAPA/EMBRAPA/FEBRAPDP, 2011. 75p.

COSTA, F. S.; GOMES, J.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.. Métodos para avaliação das emissões de gases do efeito estufa no sistema solo-atmosfera. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.2, p.693-700, 2006.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1995.

DOIGNON-BOURCIER, F.; WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; LAGUERRE, G.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P. Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* Strains Nodulating Small Senegalese Legumes by 16S-23S rRNA Intergenic Gene Spacers and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprint Analyses. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 66, n. 9, p. 3987-3997, 2000.



EDEN, M. J.; BRAY, W.; HERRERA, L.; MCEWAN, C. Terra Preta Soils and their archaeological context in the Caqueta Basin of southeast Colombia. v. 49, n. 1-2, p. 125–140, 1984.

FAO (2015). FAOSTAT. **Crops. Cow peas, dry**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em 30 de agosto de 2016.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 8, p. 911-920, 2003.

FERNANDES-JÚNIOR, P.I.; REIS, V.M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252).

FERNANDES-JÚNIOR, P.I.; SILVA JÚNIOR, E.B. da; SILVA JÚNIOR, S.; SANTOS, C.E.R. da S. e; OLIVEIRA, P.J. de; RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R. Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. *African Journal of Biotechnology*, v.11, p.2945-2951, 2012.

FERREIRA, E.M. & CASTRO, I.V. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 27, p. 177-1183, 1995.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil : produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Embrapa Meio-Norte, Teresina, 84 p. 2011.

GARNIER, P.; NEEL, C.; AITA, C.; RECOUS, S.; LAFOLIE, F.; MARY, B. Modelling carbon and nitrogen dynamics in a bare soil with and without straw incorporation. *European Journal Soil Science*, v. 54, p. 555–568, 2003.

GŁODOWSKA, M.; SCHWINGHAMER, T.; HUSK, B.; SMITH, D. Biochar Based Inoculants Improve Soybean Growth and Nodulation. *Agricultural Sciences*, v. 8, n. 9, p. 1048-1064, 2017.

HELY, F.W.; BERGERSEN, F.J.; BROCKWELL, J. Microbial antagonisms in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover. *Australian Journal of Agricultural Research*. v. 8, n. 24, p. 44, 1957.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por Box-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 6 p. (Comunicado Técnico, 58).

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R. A.. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil tillage and two crop-rotation systems. *Applied Soil Ecology*, v. 42, p. 288-296, 2009.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate change 2001: the scientific basis**. United Kingdom: Cambridge University, 2001. 881p.

KOOKANA, R. S., SARMAH, A. K., VAN ZWIETEN, L., KRULL, E.; SINGH, B. Biochar application to soil: Agronomic and environmental benefits and unintended consequences. *Advances in Agronomy*, v.112, n.1, p.103-143, 2011.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade de feijão-caupi. *Revista Ceres*, v. 51, p. 67-82, 2004.

LEHMANN, J. Bio-energy in the black. *Frontiers in Ecology and the Environment*. V. 5, n. 7, p. 381-387, 2007.

LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D.; Biochar effects on soil biota e A review. *Soil Biology & Biochemistry*, City, v. 43, n. 9, p. 1812-1836, 2011.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. 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.

LIMA, M. A.; BOEIRA, R. C.; CASTRO, V. L. S.; LIGO, M. A. V.; CABRAL, O. M. R.; VIEIRA, R.. Estimativa das emissões de gases de efeito estufa provenientes de atividades agrícolas no Brasil. In: *Mudanças Climáticas Globais e a Agropecuária Brasileira*, eds. LIMA, M. A., CABRAL, O.M.R., MIGUEZ, J. D. G., 2001, 397p. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.

LIMA, S. L.; MARIMON-JUNIOR, B. H.; SANTOS, K. S. M.; REIS, S. M.; PETTER, F. A.; VILAR, C. C.; MARIMON, B. S. Biochar no manejo de nitrogênio e fósforo para

a produção de mudas de angico. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 51, n. 2, p. 120-131, 2016.

LIN, G.; YANG, H.; HU, J.; LUO, Y.; SHAO, J.; WANG, X.; CHEN, H. Effects of the physicochemical properties of biochar and soil on moisture sorption. *Journal Of Renewable And Sustainable Energy*, Beijing, v. 8, n. 6, 2016.

LYRA, M. C. C. P. L.; SILVA, M. L. R. B; OLIVEIRA, J. P. Sistema de secreção de proteínas do tipo III (T3SS) em Rhizobiaceae. In: **MICROORGANISMOS E AGROBIODIVERSIDADE: o novo desafio para a agricultura**, eds. FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. 2008, 569 p. Guaíba, Agrolívros.

MAIA, C. M. B. F.. Biochar uma nova ferramenta no manejo de solos. In: Seminário de Atualização Florestal, 2.; Semana de estudos florestais, 11., Irati, 2010. Legislação Florestal e o Código Florestal Brasileiro: anais. 2010.

MARINHO, R. C. N.; FERREIRA, L. V. M.; SILVA, A. F.; MARTINS, L. M. V.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. *Soil and Plant Nutrition*, *Bragantia*, Campinas, v. 76, n. 2, p.273-281, 2017.

MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; TARSO AIDAR, S. DE; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JUNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 49, n. 5, 2014.

MARINHO, R. de C. N.; FERREIRA, L. de V. M.; SILVA, A. F. da; MARTINS, L. M. V.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. *Bragantia*, Campinas, v. 76, n. 2, p. 273-281, 2017.

MARINHO, R. DE C. N.; NÓBREGA, R. S.; ZILLI, J. É.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. DE T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 49, n. 5, p. 395-402, 2014.

MATOS-FILHO, C. H. A.; GOMES, R. L. F.; ROCHA, M. M.; FREIRE FILHO, F. R.; LOPES, Â. C. A.. Potencial produtivo de progênies de feijão-caupi com arquitetura ereta de planta. *Ciência Rural*, v. 39, n. 2, p. 348-354, 2009.

MELO, S. R.; ZILLI, J. É. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.44, n.9, p.1177-1183, 2009.

MENDES, L. C.; HUNGRIA, M.; REIS-JUNIOR, F.B.; FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M.; MERCANTE, F. M.; ZILLI, J. É.. **Bioindicadores para avaliação da qualidade dos solos tropicais: Utopia ou realidade.** Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2009. 31 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 246).

MENNA, P. M.; HUNGRIA, F.G.; BARCELLOS, E. V.; BANGEL, P. N.; HESS, E.; MARTINEZ-ROMERO. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology*. 29:315-332. 2006.

MOTHAPO, N. V.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J.E.; SHI, W.; ISLEIB, T. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. *Applied Soil Ecology*, v. 64, p. 201–213, 2013.

NORRIS, D. O.; MANNETJE, L. ' . The Symbiotic Specialization of African Trifolium Spp. in Relation to their Taxonomy and their Agronomic Use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, v. 29, n. 3, p. 214–235, 1964.

PEREIRA, J.C. 2000. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera.** Seropédia. Embrapa Agrobiologia, 15p. (Embrapa- CNPAD. Documentos, 118).

PETTER, F. A.. **Biomassa carbonizada como condicionador de solo: aspectos agrônômicos e ambientais do seu uso em solos de cerrado.** Goiânia – GO, Universidade Federal de Goiás. 2010. 130 p. Tese (Doutorado).

QUILLIAM, R. S.; DELUCA, T. H.; JONES, D. L. Biochar application reduces nodulation but increases nitrogenase activity in clover. *Plant and Soil*, v. 366, n. 1–2, p. 83–92, 2013.

RADL, V.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; LEITE, J.; PASSOS, S.R.; MARTINS, L.M.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; BALDANI, J.I.; ZILLI, J.E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in the semi-arid of Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.64, p.725-730, 2014.

REICOSKY, D.C.; LINDSTROM, M.J. Fall till age method: effect on short-term carbon dioxide flux from soil. *Agronomy Journal*, v. 85, p. 1237-1243, 1993.

ROCHA, M. DE M.; FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; CARVALHO, H. W. L.; BERLAMINO-FILHO, J.; RAPOSO, J. A. A.; ALCÂNTARA, J. P.; RAMOS, S. R. R.; MACHADO, C. DE F.. Adaptabilidade estabilidade produtiva de genótipos de feijão-caupi de porte semiereto na região Nordeste do Brasil. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. p. 1283-1289, 2007.

RONDON, M. A.; LEHMANN, J.; RAMÍREZ, J.; HURTADO, M. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. *Biological and Fertility Soil*. v. 43, p. 699–708, 2007.

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

SÁ, J.C.M.; CERRI, C.C.; DICK, W.A.; LA L, R.; FILHO, S.P.V.B.; PICCOLO, M.C.; FEIGL, B.E. Organic matter dynamics and carbon sequestration rates for a tillage chronosequence in a Brazilian oxisol. *Soil Science Society of America Journal*, 65, p. 1486–1499, 2001.

SÁNCHEZ-GARCÍA, M.; ROIG, A.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M.; CAYUELA, M. L. Biochar increases N<sub>2</sub>O emissions produced by nitrification-mediated pathways. *Frontiers in Environmental Science*. v. 2, n. 25, 2014.

SEEG - Sistema de Estimativas de Emissões de Gases de Efeito Estufa, **Evolução das emissões de gases de efeito estufa no Brasil (1970-2013)**: setor agropecuário / Instituto de Manejo e Certificação Florestal e Agrícola (IMAFLORA). – São Paulo : Observatório do Clima, 2015. 57 p.

SIGNOR, D.; CERRI, C. E. P. Emissões de óxido nitroso em solos agrícolas: uma revisão. *Pesquisa Agropecuária Tropicropical* [online]. v. 43, n. 3, p. 322-338, 2013.

SILVA, I. C. B.; BASÍLIO, J. J. N.; FERNANDES, L. A.; COLEN, F.; SAMPAIO, R. A.; FRAZÃO, L. A. Biochar from different residues on soil properties and common bean production. *Sciëntia Agricola*. v.74, n.5, p.378-382, 2017.

SILVA, I. C. B.; FERNANDES, L. A.; COLEN, F.; SAMPAIO, R. A. Growth and production of common bean fertilized with biochar. *Ciência Rural*, v.47, n.11, 2017.

SILVA, J. A. N.; CECCON, G.; ROCHA, E. C.; SOUZA, C. M. A. Produtividade de feijão-caupi e braquiária com inoculação nas sementes, em cultivo solteiro e consorciado. *Revista Agrarian*, v.9, n.31, p. 44 - 46, 2016.

SILVA, J. A.; UCHIDA, R. Bioslogical nitrogen fixation nature's partnership for sustainable agricultural production. In: *Plant nutrient management in Hawaii's soils, Approaches for Trop. Subtrop. Agric.* College of Trop. Agric. Human Resour. Hawaii: Manoa, p. 121-126. 2000.

SINGH, B. B. Cowpea breeding at IITA: highlights of advances impacts. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 1.; REUNIÃO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 6., 2006, Teresina. Tecnologias para o agronegócio: anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006. 1 CD-ROM. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 121). soil solutions. *Soil Science Society of America Journal*, v. 52, p. 1191-1192, 1988.

SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; MACIEL, C.D.; CAMPO, R.J. & ZAIA, D.A.M. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 43, p. 83-91, 2008.

SPIAGGIA, F. E. C.. **Marcadores de DNA na caracterização de germoplasma de feijão macassar [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. 2003. 47 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – UFPE, Recife-PE, 2014.

STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P.; VARGAS, V. P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 32, p. 1107-1120, 2008.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 58p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 93). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/27318/1/doc093.pdf>

TAIZ, L.; ZEIGER, E.. *Fisiologia Vegetal*. 5ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2013. 918 p.

TAMPAKAKI, A. P.; FOTIADIS, C. T.; NTATSI, G.; SAVVAS D. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 179 – 189, 2017.

THIES, J.; RILLIG, M.; GRABER, E. **Biochar effects on the abundance, activity and diversity of the soil biota. Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation.** p. 327-390, 2015.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria.** [s.l.] [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific, 1970.

WANG, L.; CAO, Y.; WANG, E. T.; QIAO, Y. J.; JIAO, S. LIU, Z. S.; ZHAO, L.; WEI G. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. *Systematic and Applied Microbiology*, New York, v. 39, n. 3, P. 211-219, 2016.

WARNOCK, D. D.; LEHMANN, J.; KUYPER, T. W.; RILLIG, M. C.; Mycorrhizal responses to biochar in soil – concepts and mechanisms. *Plant and Soil*, v. 9, n. 20, 2007.

WEI, G. H.; TAN, Z. Y.; ZHU, M. E.; WANG, E. T.; HAN, S. Z.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 5, p. 1575–1583, 2003.

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

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L.. Inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a produtividade de grãos de feijão-caupi. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2037-2041, 2008.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L.. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. *Ciência Rural*, v. 37, n. 2, p. 561-564, 2007.

ZAHARAN, H. H. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Beni-Suef,. p. 968-989. 1999.

ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A.. **A cultura de Feijão-Caupi na Amazônia Brasileira.** Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2009. 356 p.