



**TAINARA LOUZADA RODRIGUES**

**DIVERSITY AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF  
RHIZOBIA ISOLATED FROM LIMA BEAN NODULES  
COLLECTED AT SEMI-ARID REGION**

**LAVRAS – MG  
2020**

**TAINARA LOUZADA RODRIGUES**

**DIVERSITY AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF RHIZOBIA ISOLATED  
FROM LIMA BEAN NODULES COLLECTED AT SEMI-ARID REGION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo na área de concentração Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Mestre.

Profª. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
Orientadora

Dra. Márcia Rufini  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rodrigues, Tainara Louzada.

Diversity and biotechnological potential of rhizobia isolated  
from lima bean nodules collected at semi-arid region / Tainara  
Louzada Rodrigues. - 2020.

72 p. : il.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Coorientador(a): Márcia Rufini.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Inoculante. 3. Phaseolus  
lunatus. I. Moreira, Fatima Maria de Souza. II. Rufini, Márcia. III.  
Título.

**TAINARA LOUZADA RODRIGUES**

**DIVERSITY AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF RHIZOBIA ISOLATED  
FROM LIMA BEAN NODULES COLLECTED AT SEMI-ARID REGION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo na área de concentração Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 12 de agosto de 2020

Profa. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega – UFRB

Prof. Dr. Teotonio Soares de Carvalho – UFLA

Dra. Amanda Azarias Guimarães



Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
Orientadora

Dra. Márcia Rufini  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2020**

À Deus, minha família e a sociedade,

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido mais essa oportunidade de crescimento e aprendizado pessoal e profissional. Por ter me amparado diante das dificuldades e provido muitas bênçãos em minha vida nesse período!

À minha família por todo incentivo e amor. Por serem minhas referências de honestidade e persistência.

À Universidade Federal de Lavras, instituição que tenho muito respeito e admiração, em especial ao Departamento de Ciência do Solo (docentes, discentes, técnicos e demais funcionários), no qual vivi boa parte da minha trajetória universitária e muito contribuiu para o que sou.

Às instituições de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG.

À Professora Fatima, pela oportunidade e suporte, por ser meu exemplo de comprometimento e dedicação; por além de orientadora, ser amiga, compreensiva e me querer sempre bem.

À Márcia e Elaine, por toda disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos, por toda atenção e amizade.

À Aline, Flávia e Débora, por serem pessoas que eu sempre pude contar na vida pessoal e acadêmica. Se tornaram minhas irmãs de coração, presentes que a UFLA me deu!

À Alessandra, minha amiga de infância. Mulher de aço, que me ensina muitas lições e me ajuda a ser um ser humano melhor!

Aos demais amigos e colegas que fizeram parte da minha jornada!

Por fim, agradeço ao meu amado amigo Alfredo, que lá de cima continuará sempre torcendo por mim, como sempre fez em todos os momentos. Obrigada por sempre me incentivar a fazer o que eu acredito, por ter sempre um sorriso e uma palavra amiga e positiva! Por ser exemplo de humildade, solidariedade e me ensinar que a vida não é para ser levada tão a sério!

Muito obrigada!

## RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (N) viabiliza a absorção de N para nutrição dos vegetais de forma eficaz pelas perspectivas agrônômica, econômica e ambiental devido à economia no uso de fertilizantes nitrogenados, com redução no custo de produção e nos impactos provenientes da fabricação, uso indiscriminado e manejo inadequado desses insumos. O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é a segunda espécie do gênero *Phaseolus* em importância mundial. No Brasil é cultivado principalmente no nordeste por sua rusticidade em condições semiáridas. Além de alternativa de renda, o feijão-fava é usado como alimento, adubo verde e cultura de cobertura. Apesar de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), ainda não existe inoculante para utilização em seu cultivo. O objetivo da pesquisa foi caracterizar fenotipicamente e genotipicamente BFN isoladas de nódulos de feijão-fava coletados no semiárido brasileiro e avaliar a eficiência das mesmas na nutrição nitrogenada da cultura em condições axênicas e em um Latossolo Vermelho distrófico húmico com e sem correção da acidez. O isolamento e caracterização fenotípica foram realizados em meio 79 sólido e a caracterização genotípica feita pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. As eficiências simbióticas foram avaliadas em casa de vegetação em condições axênicas usando tubetes contendo vermiculita e areia e após, em vasos com solo não autoclavado com e sem calagem. Os tratamentos consistiram nas estirpes avaliadas e controles utilizando-se delineamento estatístico apropriado. Ao todo, 66 estirpes foram isoladas dos nódulos. Foi constatada diversidade fenotípica e genotípica com predominância de estirpes de crescimento intermediário, alcalinizantes e com abundante produção de goma, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. A calagem proporcionou incrementos no desenvolvimento do feijão-fava, havendo interação com algumas estirpes. Seis estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, pertencentes aos grupos de estirpes tipo que incluem as de *B. elkanii* e *B. japonicum*, destacaram-se por seu potencial biotecnológico como inoculante ao feijão-fava e as mesmas devem ser testadas em campo visando validar sua indicação como inoculante para esta cultura.

**Palavras-chave:** *Bradyrhizobium*. Calagem. Fixação biológica de nitrogênio. Inoculante. *Phaseolus lunatus*. Gene 16S rRNA

## GENERAL ABSTRACT

The biological fixation of nitrogen (N) enables the absorption of N for plant nutrition in an efficient manner from an agronomic, economic and environmental perspective due to the savings in the use of nitrogen fertilizers, with a reduction in the cost of production and in the impacts arising from the manufacture, use indiscriminate and improper handling of these inputs. Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is the second species of the genus *Phaseolus* in worldwide importance. In Brazil it is cultivated mainly in the northeast due to its rusticity in semi-arid conditions. In addition to income alternatives, lima beans are used as food, green manure and cover crops. Despite establishing symbiosis with nitrogen-fixing bacteria (NFB), there is still no inoculant for use in its cultivation. The objective of the research was to characterize phenotypically and genotypically NFB isolated from nodules of lima beans collected in the brazilian semi-arid region and to evaluate their efficiency in nitrogen nutrition of the culture under axenic conditions and in a Humic Rhodic Hapludox with and without acidity correction. Isolation and phenotypic characterization were performed in solid medium 79 and genotypic characterization was done by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The symbiotic efficiencies were evaluated in a greenhouse under axenic conditions using tubes containing vermiculite and sand and afterwards, in pots with non-autoclaved soil with and without liming. The treatments consisted of the strains evaluated and controls using an appropriate statistical design. In total, 66 strains were isolated from the nodules. Phenotypic and genotypic diversity was found with predominance of intermediate growth strains, alkalizing and with abundant gum production, belonging to the genus *Bradyrhizobium*. Liming provided increases in the development of fava beans, with interaction with some strains. Six strains of the genus *Bradyrhizobium*, belonging to the groups of type strains that include those of *B. elkanii* and *B. japonicum*, stood out for their biotechnological potential as inoculant to lima beans and they must be tested in the field in order to validate their indication as inoculant for this culture.

**Keywords:** *Bradyrhizobium*. Liming. Biological nitrogen fixation. Innocuous. *Phaseolus lunatus*. 16S rRNA gene



## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>9</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Nitrogênio: importância e alternativas de manejo sustentáveis para a agricultura</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Fixação biológica de nitrogênio – características gerais, importância agroambiental, fatores limitantes, diversidade e potencial</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas para espécies leguminosas</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4 Uso de inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio na produção agrícola</b> .....	<b>18</b>
<b>2.5 Feijão-fava: origem e distribuição, morfologia e composição nutricional, utilização, aspectos socioeconômicos e agroambientais</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6 Simbiose entre feijão-fava e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas</b> .....	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>24</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> .....	<b>31</b>
<b>Diversity and biotechnological potential of rhizobia isolated from lima bean nodules collected at semi-arid region</b> .....	<b>31</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), também conhecido por feijão-de-lima pertence à família Leguminosae e é uma das cinco espécies cultivadas do gênero *Phaseolus* (FOFANA, 1999; MAQUET et al., 1999), ocupando a segunda colocação mundial em importância econômica, ficando atrás apenas do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Além disso, é uma das principais leguminosas cultivadas nas Américas do Norte e do Sul, Europa, Ásia e África (BAUDOIN, 1988, BROUGHTON et al., 2003).

No nordeste brasileiro, região que lidera a produção nacional, o feijão-fava é uma das principais fontes de proteína para humanos e animais devido a sua maior adaptação e rusticidade às condições semiáridas (MAQUET et al., 1999). Sua relevância socioeconômica apresenta ainda, potencial de redução da dependência de outras leguminosas como o feijão-comum e caupi (*Vigna unguiculata* L.), colaborando para segurança alimentar da crescente população mundial. No entanto, a maior parte da sua produção é proveniente de pequenos produtores, sem adoção de tecnologias, o que associado a outros fatores, contribui para uma baixa produtividade (IBGE, 2017).

Assim como outras espécies de plantas da família Leguminosae, o feijão-fava apresenta a capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL). A partir dessa característica, o manejo da cultura pode ser aprimorado, de forma a incrementar a produtividade de maneira barata, rentável e ecologicamente sustentável, por meio da seleção de BFNNL com objetivo de identificar o par simbiótico de maior potencial agrônômico, sendo a nutrição nitrogenada suprida total ou parcialmente via fixação biológica.

Entretanto, a diversidade fenotípica e genética, e a eficiência simbiótica de BFNNL isoladas de nódulos de feijão-fava para posterior recomendação como inoculante para a cultura, têm sido pouco estudadas (COSTA et al., 2017). O processo de seleção de BFNNL para culturas de interesse agrícola, pastoril e/ou florestal se baseia em quatro etapas, iniciando com experimentos em condições ideais e com alto número de isolados, até etapas não axênicas e campo, com reduzido número de isolados pré-selecionados nas etapas anteriores pelo melhor desempenho simbiótico.

Em feijão-fava tem sido observado estabelecimento de uma simbiose efetiva com estirpes de *Bradyrhizobium* (ARAÚJO et al., 2017; COSTA et al., 2017). Uma grande

vantagem desse gênero é que a maioria dos seus genes de nodulação e fixação de  $N_2$  localiza-se no cromossomo (MASTERSON et al., 1985), conferindo-lhes estabilidade genética. Esta característica é extremamente importante para que a estirpe selecionada permaneça eficiente em fornecer N para a espécie vegetal ao longo dos anos.

Apesar disso, não existem estirpes aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para inoculação em feijão-fava, devido principalmente à ausência de trabalhos que englobem todos os processos necessários no desenvolvimento de inoculante para a cultura de acordo com os critérios estabelecidos pelo MAPA. Isso reforça a necessidade de se isolar, caracterizar, identificar, avaliar a eficiência e selecionar bactérias capazes de estabelecer uma simbiose eficiente com essa espécie, visando aumento da produtividade, difusão de biotecnologia, sustentabilidade de cultivo e lucratividade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Nitrogênio: importância e alternativas de manejo sustentáveis para a agricultura

O nitrogênio (N) é um elemento essencial exigido em grandes quantidades pela maioria das espécies de plantas em comparação a outros nutrientes, apresentando importância no metabolismo vegetal por compor moléculas de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, enzimas, entre outras.

Assim sendo, o N é fundamental para os processos celulares das plantas e sua insuficiência ou ausência na nutrição vegetal se torna fator limitante ao crescimento e desenvolvimento das diversas culturas e, conseqüentemente, à produtividade agrícola exibindo redução dos grãos em quantidade e qualidade, amarelecimento e clorose das folhas devido à proteólise que reduz o conteúdo de clorofila afetando diretamente a fotossíntese (MENGEL; KIRKBY, 1982; MALAVOLTA; VITTI, 1997; TEIXEIRA et al., 2010).

Dentre os gases presentes no ar atmosférico, o  $N_2$  representa cerca de 78% do total, porém este se encontra em uma forma quimicamente inerte em temperatura ambiente, necessitando de catalisadores para sua transformação às formas assimiláveis pelas plantas ( $NH_4^+$  e  $NO_3^-$ ). Já na litosfera, os teores de N são naturalmente baixos, com reservatório da matéria orgânica limitado, principalmente em condições tropicais (HUNGRIA et al., 2007).

No solo, além de escasso, o N é um nutriente com dinâmica complexa, instável e sujeito a diversas possibilidades de perdas relacionadas a fatores bióticos e abióticos. A maior parte do N no sistema edáfico está em frações cuja mineralização é muito lenta, tornando disponível em forma inorgânica combinada apenas dois a três por cento do N total presente no solo a cada ano. Além disso, essa fração mineralizável é susceptível a volatilização, lixiviação, desnitrificação, imobilização e adsorção pelas partículas do solo (BOUWMAN et al., 1997).

Há três maneiras de transformação do  $N_2$  para formas assimiláveis pelas plantas. São elas: 1) Descargas elétricas, combustão e vulcanismo, porém ocorrem em quantidades desprezíveis para fornecer o N necessário aos vegetais em termos agrícolas; 2) Processo industrial (Haber-Bosch), o qual utiliza combustíveis fósseis, elevadas pressões e temperaturas para fabricação dos fertilizantes nitrogenados, sendo oneroso e podendo ser prejudicial ao ambiente como um todo, além de sua eficiência agrônômica ser dependente de condições edafoclimáticas específicas, as quais nem sempre estão propícias no momento de aplicação do insumo; 3) Fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada por bactérias diazotróficas, sendo esta a forma mais eficaz de fornecimento do N para os vegetais sob os

aspectos econômicos, agrônômicos e ambientais, por ser natural, manipulável e eficiente na nutrição nitrogenada das plantas, especialmente as da família Leguminosae, onde o processo de fixação de  $N_2$  ocorre em estruturas especializadas denominadas nódulos, o que garante total aproveitamento do nutriente.

Em termos globais, estima-se que a fixação de  $N_2$  dada por fenômenos da natureza como descargas elétricas, combustão e vulcanismo contribua com 10% da entrada anual de N nos ecossistemas, enquanto que a produção industrial da amônia contribui com 25% a altos custos econômicos e ambientais. O processo biológico apresenta a relevância de 65%, sendo o maior provedor desse nutriente para os seres vivos no planeta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A vida na Terra se extinguiria em aproximadamente 30 anos se a FBN parasse.

Na agricultura, os fertilizantes minerais representam a forma assimilada com maior agilidade e facilidade pelas plantas, pois os nutrientes estão prontamente disponíveis. Em contrapartida, a eficiência dos fertilizantes nitrogenados dificilmente ultrapassa 50%, o que representa grandes perdas a altos custos financeiros e ecológicos (TEIXEIRA et al., 2010). Logo, para se fornecer a quantidade de N demandada pelas culturas deve-se considerar, entre outros, as perdas durante o processo de desenvolvimento das lavouras (ANGHINONI, 1986; LEIGH, 2004).

Análise realizada pelo USDA (2014) constatou que, nos últimos anos, o custo de produção dos fertilizantes nitrogenados sofreu aumentos significativos, proporcionais ao aumento da demanda, o que aliado a maior quantidade a ser aplicada para suprir as culturas contribui para elevar os custos de produção agrícola, o valor do produto final e também os danos ambientais causados pelo processo de produção do mesmo e posteriormente, por suas perdas que são possíveis contaminantes de solo, água e ar.

Por conseguinte, os custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam reduzir ou substituir a utilização desses insumos na agricultura sem que haja perda de produtividade, suprimindo a demanda das espécies vegetais e gerando incrementos de forma socioeconômica e sustentável, remetendo, portanto, a necessidade de se explorar a FBN como a forma mais eficiente de nutrição nitrogenada às espécies vegetais, em especial as leguminosas, para produção de alimentos (NEWTON, 2000; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CANTARELLA, 2007).

O atual cenário da globalização de mercados e o crescimento da população mundial, que deve atingir mais de nove bilhões de pessoas em 2050 (FAO, 2009), requer maior oferta de alimentos. Para que o agronegócio atenda a esta demanda, o uso racional de insumos

químicos, como os fertilizantes nitrogenados, e o desenvolvimento de novas biotecnologias alternativas a esses, como inoculantes para mais espécies vegetais, se fazem necessários.

## **2.2 Fixação biológica de nitrogênio – características gerais, importância agroambiental, fatores limitantes, diversidade e potencial**

Dentre os sistemas biológicos constituídos pela interação plantas-microrganismos, a simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (BFNN) e espécies leguminosas é o de maior expressão econômica, com benefícios sustentáveis para produção de alimentos (FRANCO et al., 2002; XAVIER et al., 2006). Em termos globais, a FBN é o segundo processo biológico em importância para a vida na Terra, superado apenas pela fotossíntese. Cerca de 40 a 60 milhões de toneladas de  $N_2$  são fixadas biologicamente nos sistemas agrícolas (GRAHAM; VANCE, 2003), representando aproximadamente metade do N utilizado na agricultura.

O processo de FBN é mediado por uma pequena parcela de procariotos chamados diazotróficos, com representantes em diversos ramos filogenéticos. Estes podem ser de vida livre no solo, viverem associados aos tecidos vegetais e fixarem  $N_2$  sem a formação de uma estrutura específica para tal, ou no caso das bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL), estabelecerem simbiose com espécies de plantas da família Leguminosae ocorrendo formação de estruturas hipertróficas radiculares, chamadas de nódulos (DÖBEREINER, 1966; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os nódulos são formados pela ativação dos genes de nodulação das BFNNL através de sinais quimiotáxicos liberados pelo vegetal, estimulando a infecção dos pelos radiculares. Nessas estruturas, o processo de FBN tem condições de expressar todo seu potencial na transformação do  $N_2$  para a nutrição do vegetal, podendo dispensar total ou parcialmente os adubos nitrogenados (MOREIRA, 1994).

Diversos trabalhos relatam benefícios como solubilização de fosfatos inorgânicos, promoção de crescimento e produção de fitormônios (MARRA et al., 2012; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2013; COSTA et al., 2016) promovidos por diferentes gêneros de diazotróficos, evidenciando que as BFNNL podem contribuir por meio de outros processos, em adição à FBN, para o desenvolvimento de espécies vegetais.

Na interação BFNN – espécies leguminosas, o microrganismo fornece à planta o N na forma inorgânica combinada devido à ação da enzima nitrogenase e em contrapartida, a planta fornece ao microssimbionte carboidratos necessários ao seu metabolismo, provenientes da fotossíntese, sendo, portanto, uma relação mutualista.

A atividade da FBN em leguminosas é facilmente detectada através da coloração avermelhada no interior dos nódulos, característica conferida pela presença da leghemoglobina, substância que leva oxigênio ao bacteroide a uma taxa que não afeta o funcionamento da nitrogenase, que é altamente sensível a este elemento (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

De acordo com Denison e Harter (1995), outro importante fator que interfere na efetividade da ação da nitrogenase é o suprimento de N mineral. Quando este nutriente está presente no solo em quantidades suficientes ao metabolismo vegetal, a planta não desprende energia para estabelecer simbiose, pois o gasto energético para tal é mais elevado do que para a absorção das fontes prontamente disponíveis de N dos fertilizantes.

Outros quesitos intrínsecos como especificidade de hospedeiro, e extrínsecos como condições edafoclimáticas, também podem interferir no processo de FBN. De modo geral, fatores que afetam negativamente o crescimento e desenvolvimento vegetal, também são prejudiciais para o estabelecimento e ocorrência efetiva da FBN; Assim como na presença de condições adequadas para o crescimento e desenvolvimento vegetal, a FBN também é beneficiada.

O fator acidez no solo, que é um dos principais limitantes ao crescimento vegetal em solos tropicais, além de prejudicar o desempenho simbiótico de algumas estirpes de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, pode comprometer o desenvolvimento vegetal pela maior concentração de alumínio e manganês na solução do solo, baixa capacidade de troca de cátions e redução da absorção de alguns nutrientes devido a menor disponibilidade destes em baixo pH. Sendo, portanto, o pH um dos principais fatores limitantes à simbiose BFNN-leguminosas (VARGAS; GRAHAM, 1988; RUFINI et al., 2011)

Algumas espécies de BFNNL podem tolerar melhor a acidez do que outras, e essa tolerância pode variar entre estirpes de uma mesma espécie. Estudos mostram que as BFNNL crescem em uma faixa de pH ideal variando de 6,0 a 7,0, e uma menor parcela crescem bem em pH abaixo destes (GRAHAM et al., 1994; RODRIGUES et al., 2006; ALI et al., 2009).

Em geral, estirpes de crescimento rápido são menos tolerantes à acidez do que as de crescimento lento (GRAHAM et al., 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Estirpes isoladas de solos ácidos mostram-se mais adaptadas a essas condições do que as isoladas de solos com pH mais elevado (MOREIRA, 1994), indicando boa correlação entre a origem das estirpes e sua tolerância à acidez. De acordo com Dilworth et al., (1999), esse fato pode ser explicado pelo fenômeno denominado “*adaptive tolerance response*” ou “*acid habituation*”.

A fase inicial da FBN é a mais sensível à acidez, incluindo a exsudação de sinais quimiotáticos pela planta e a síntese dos fatores *nod* pela bactéria, com consequências no estabelecimento da simbiose. Para maximizar a contribuição da FBN em leguminosas é necessário que as estirpes sejam eficientes em fixar N<sub>2</sub>, competitivas com a população nativa pelos sítios de infecção na espécie alvo e sejam adaptadas às diversas condições edafoclimáticas, incluindo solos ácidos que representam grande parte dos solos do território brasileiro e de outros países.

Os benefícios da simbiose entre rizóbios e leguminosas podem ser otimizados pelo uso de inoculante a base de estirpes eficientes, selecionadas e adaptadas de acordo com a espécie vegetal e região. Como resultado de pesquisas conjuntas entre seleção de BFNN e melhoramento genético, atualmente a cultura da soja (*Glycine max* L.), que é uma das principais *commodities* do agronegócio brasileiro, é o exemplo de maior sucesso da FBN, mantendo altos patamares de produtividade sem o uso de fertilizantes nitrogenados.

As BFNNL apresentam alta diversidade fenotípica, genética e fisiológica, garantindo a ocorrência do processo de FBN nos mais diversos ecossistemas do Brasil (GUIMARÃES et al., 2012) e do mundo, o que estimula e enfatiza a necessidade de pesquisas que identifiquem e testem a eficiência das mesmas com culturas de interesse agrônomo, vislumbrando aumentar a produção e o uso de inoculantes para que mais espécies vegetais possam se beneficiar desta biotecnologia.

A variabilidade entre os organismos vivos é dita diversidade biológica e pode ser avaliada por níveis taxonômicos, características fenotípicas e/ou genéticas. No sistema edáfico, tal diversidade é de suma importância para as relações ecológicas e serviços ecossistêmicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Conhecer a diversidade microbiana do solo é vantajoso para a compreensão das funções exercidas pelos microrganismos, que podem inclusive, refletir na qualidade ambiental, produtividade agrícola entre outros (ARAÚJO et al., 2002).

O uso de ferramentas atuais que auxiliem no avanço desse conhecimento, como a utilização dos chamados cronômetros moleculares - moléculas universais altamente conservadas evolutivamente e sem influência de mudanças ambientais (WOESE, 1991), sendo o mais comum o gene 16S rRNA - possibilitam a descrição de novas espécies de microrganismos. O estudo da diversidade de BFNNL contribui para o conhecimento sobre a distribuição das mesmas nos diferentes ecossistemas, e para identificação de estirpes com potencial biotecnológico, visando a ampliação e otimização do processo de FBN e seus múltiplos benefícios agroambientais.



### **2.3 Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas para espécies leguminosas**

A seleção de BFNNL é uma importante fase que antecede a recomendação de estirpes como inoculante para determinada espécie vegetal para aprovação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O uso de inoculantes inespecíficos e com bactérias que apresentem baixa capacidade competitiva resultam em queda do rendimento das culturas (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

Selecionar organismos mais eficientes que atuem na nutrição nitrogenada de diferentes espécies vegetais tem sido objeto de vários estudos que resultaram na aprovação de estirpes para cerca de 100 espécies leguminosas no Brasil (BRASIL, 2011) devido às múltiplas vantagens oferecidas quando se há o estabelecimento de uma simbiose eficaz, o que torna a biotecnologia muito atrativa diante do desafio de produzir mais alimentos para uma crescente população, de forma rentável e ambientalmente sustentável.

De maneira geral, o processo de seleção de BFNNL envolve quatro etapas. A primeira é conduzida em condições axênicas, com solução nutritiva em casa de vegetação, utilizando recipientes menores devido a grande quantidade inicial de estirpes obtidas do isolamento de nódulos coletados no campo ou de diluições de amostras de solo utilizando uma planta “isca” que é geralmente uma espécie promíscua ou a espécie alvo para a qual se pretende isolar as estirpes compatíveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CASTRO et al., 2017; SILVA et al., 2020), com objetivo de autenticar, ou seja, verificar quais inóculos são nodulíferos.

Na segunda etapa do processo de seleção, também conduzido em condições axênicas, utilizam-se recipientes maiores contendo substrato inerte, permitindo condução por período de tempo maior para se avaliar a eficiência simbiótica dos isolados que foram nodulíferos na etapa anterior, a exemplo do realizado nos trabalhos de Rufini et al., (2014) e Ribeiro et al., (2015).

As duas primeiras etapas podem ser substituídas por apenas uma se utilizado recipientes de tamanho intermediário, como tubetes, que permitem testar várias estirpes e ainda avaliar a eficiência simbiótica. Estirpes que demonstram ausência de nodulação ou baixo desempenho nas etapas iniciais não prosseguem para as posteriores, pois se subentende que se elas não apresentaram bom potencial simbiótico em condições ótimas de cultivo, a mesma situação se manterá ou será acentuada quando estas forem submetidas a condições de estresses bióticos e abióticos das etapas seguintes (LACERDA et al., 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na terceira fase do processo de seleção de BFNNL, as estirpes selecionadas pelo desempenho satisfatório na etapa anterior são testadas em ensaios com solos não autoclavados

em casa de vegetação, visando avaliar se a eficiência simbiótica se mantém mesmo diante de competição com comunidades de microrganismos nativos do solo (LACERDA et al., 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Do grande número de isolados iniciais, poucas estirpes chegam aos experimentos finais do processo de seleção de BFNNL, sendo estas testadas em condições de campo, em diferentes condições edafoclimáticas. Para recomendação de BFNNL, o MAPA estabelece por meio da Instrução Normativa nº 13 de 24 de março de 2011 (BRASIL, 2011) que experimentos de campo sejam conduzidos em quatro locais se considerado uma única safra, ou em dois locais se forem conduzidos em duas safras.

Todas as etapas mencionadas são necessárias e importantes no processo de seleção de BFNNL, utilizando delineamento estatístico apropriado, e além das estirpes em teste, são adicionados tratamentos controles que servem de subsídio para as avaliações dos resultados e verificação de contaminação dos ensaios axênicos.

Diversos fatores bióticos e abióticos tais como teores de nutrientes do solo, umidade, temperatura, salinidade, instabilidade genética do microrganismo e especificidade hospedeira, podem influenciar a FBN (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A acidez do solo constitui um dos principais fatores limitantes ao estabelecimento e/ou efetividade do processo (VARGAS; GRAHAM, 1988; RUFINI et al., 2011), justificando a importância de este fator ser também levado em consideração no processo de seleção de BFNNL.

Estirpes eficientes em fixar  $N_2$  em uma faixa de pH variando de ácido à alcalino, é de interesse principalmente se a cultura for cultivada sob baixos níveis tecnológicos, em que muitas vezes o produtor não realiza correção do solo de forma adequada, e considerando a ampla diversidade de condições edafoclimáticas do Brasil.

Outros parâmetros analisados no processo de seleção de BFNNL são a especificidade de hospedeiro e fixação na espécie alvo, estabilidade genética, sobrevivência (LIMA et al., 2005; ZILLI et al., 2006) e as variáveis de nodulação, sendo a massa de nódulos bastante correlacionada com a eficiência simbiótica da FBN (DÖBEREINER, 1966; HUNGRIA; BOHRER, 2000; COSTA et al., 2017). Dobert e Blevins (1993) observaram em feijão-fava que a produção de nódulos, massa seca da parte aérea e taxas de FBN, estão associadas ao tamanho das sementes produzidas.

Os solos brasileiros apresentam alta diversidade de BFNNL (MOREIRA et al., 1993; GUIMARÃES et al., 2012; COSTA et al., 2013). Entretanto, há demanda de mais estudos que promovam o conhecimento fenotípico, genético e simbiótico das mesmas, bem como a

seleção e recomendação destas para uso como inoculante em um maior número de espécies de plantas leguminosas.

As pesquisas de seleção de BFNNL, portanto, representam alto potencial para o crescimento e desenvolvimento da agricultura, gerando resultados concretos e com retorno em melhores produtividades com menores custos de produção, o que faz da inoculação uma biotecnologia alternativa aos fertilizantes nitrogenados, sendo esta confiável, viável e eficiente, com impactos positivos em toda sociedade.

#### **2.4 Uso de inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio na produção agrícola**

O inoculante é um produto ou formulação contendo um ou mais microrganismos que exercem ação benéfica no desenvolvimento vegetal. O objetivo da inoculação é, portanto, introduzir ou aumentar a comunidade microbiana desses organismos de interesse no ambiente agrícola, com resultados em produtividade.

Após as diferentes etapas do processo de seleção de BFNNL seguindo protocolos estabelecidos pelo MAPA (BRASIL, 2011), os resultados são avaliados por meio de relatório técnico-científico que após aprovação do MAPA, permite que os referidos microrganismos sejam utilizados pelos produtores como inoculante, via semente ou solo, nas formas líquida e/ou turfosa.

A fiscalização e controle de qualidade dos inoculantes são responsabilidade do MAPA, que prevê além das normas para a seleção e desenvolvimento do mesmo, maneiras adequadas de comercialização, com informações obrigatórias sobre adequado armazenamento e validade do produto na embalagem. Estabelece também que o material usado como veículo do produto biológico deve ser desinfestado, sem contaminantes a partir da diluição  $10^{-5}$ , além do número mínimo de  $10^9$  células de BFNNL por grama ou mL de produto.

Inoculantes comerciais contendo BFNNL têm sido utilizados há mais de um século para obter maiores rendimentos agrícolas. Em 2018 no Brasil, foram comercializados em torno de 73,5 milhões de doses de inoculantes bacterianos, tonando o país líder mundial no uso de bactérias fixadoras de  $N_2$  na agricultura, além de propiciar uma economia de 24,9 bilhões de reais ao ano devido à redução de gastos com fertilizantes nitrogenados (GLOBALFERT, 2020). Do total, 87,5% das doses de inoculantes consumidas anualmente são para a cultura da soja (GLOBALFERT, 2020). Outras mais de 90 espécies leguminosas apresentam inoculante aprovado pelo MAPA (BRASIL, 2011), mas há ainda grande necessidade de difusão da eficácia e importância dessa biotecnologia para amparo de uma produção agrícola econômica, sustentável, rentável e que permita a segurança alimentar da

população por meio da abrangência do melhor cultivo de uma maior diversidade de espécies vegetais.

O feijão-fava, apesar da sua relevância socioeconômica, principalmente para a região nordeste do Brasil e para pequenos produtores, não apresenta até o momento inoculante recomendado para a cultura, o que reforça a necessidade de pesquisas que desenvolvam o mesmo, e que aliadas a outros órgãos de extensão, possam difundir essa biotecnologia e seus múltiplos benefícios socioeconômicos, agrícolas e ambientais.

## **2.5 Feijão-fava: origem e distribuição, morfologia e composição nutricional, utilização, aspectos socioeconômicos e agroambientais**

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é amplamente distribuído nas Américas do Norte e do Sul, Europa, Ásia e África (BAUDOIN, 1988) estando entre os mais de 640 gêneros e 18.000 espécies de plantas pertencentes à família Leguminosae (BROUGHTON et al., 2003). Exibe grande diversidade de genótipos com aspectos morfológicos como cor e tamanho das sementes, porte e hábito de crescimento, distintos (FOFANA et al., 1997), sendo grande parte dos materiais de crescimento indeterminado, prolongado período de floração e produção e grande número de vagens (ZORO et al., 2003).

A origem e dispersão desta espécie ainda não são elucidadas devido à carência de informações arqueobotânicas (ESQUIVEL et al., 1990), havendo teorias que evidenciam ser oriunda da América Central (MACKIE, 1943), Mesoamérica, Andes (FOFANA et al., 1997; CAICEDO et al., 1999) entre outras regiões. Esta leguminosa é uma das cinco espécies do gênero *Phaseolus* cultivadas comercialmente, ocupando a segunda posição em importância socioeconômica no mundo (FOFANA, 1999; MAQUET et al., 1999).

As sementes de feijão-fava apresentam altos teores de proteína (210-260 g kg<sup>-1</sup>), carboidratos (550-640 g kg<sup>-1</sup>), fibra (32-68 g kg<sup>-1</sup>) e minerais como K, Zn, Ca e Fe, além de baixos níveis de gordura (10-23 g kg<sup>-1</sup>) e Na (CHEL-GUERRERO et al., 2012), sendo utilizada de forma vasta e benéfica nas dietas humana e animal como fonte proteica, o que colabora para redução da dependência quase exclusiva do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (MAQUET et al., 1999). Este fato assume papel de destaque em termos nutricionais e de segurança alimentar, considerando que no ano 2050 a população da Terra ultrapassará nove bilhões de pessoas (FAO, 2009), sendo a ampliação da diversidade de espécies plantadas fundamental para suprimento da crescente demanda por alimentos.

Além disso, o feijão-fava é cultivado com finalidade de cultura de cobertura e adubação verde por apresentar alta produção de biomassa e aporte de N. Pegado et al., (2008)

constatarem efeito positivo nas características físicas, químicas e biológicas do solo utilizando feijão-fava como adubo verde.

Em nível mundial, o Estados Unidos é um dos países com notória produtividade de feijão-fava, alcançando 21.000 hectares plantados com destaque para os estados da Califórnia, Washington, Oregon, Wisconsin, Illinois e Minnesota, com produtividades superiores a 1000 quilos por hectare (SIRAIT et al., 1994; KEE et al., 1997), sendo consumido preferencialmente verde, enlatado na forma de conserva ou congelado. Dados da USDA (2019) relatam que apenas no estado da Califórnia foram cultivados cerca de 9.713 hectares.

No Brasil, os resultados definitivos do último censo agrícola (IBGE, 2017) indicam uma produtividade de feijão-fava em torno de 21.109 toneladas em uma área de 40.818 hectares, com média de 517 quilos por hectare e valor total aproximado em 35 milhões de reais. Em 2009, a área cultivada com a cultura era de 45.431 hectares. Tal redução de área e relativa baixa produtividade, estão atreladas principalmente ao escasso suporte técnico e financeiro prestados em pesquisas relacionadas às potencialidades agrônômicas da cultura aliados, entre outros, à tradição de consumo do feijão-comum e maior tempo de cocção demandado.

Os estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba, Maranhão, Rio Grande do Norte, e Piauí, em ordem decrescente, são os maiores produtores. Juntos, estes fazem do nordeste do Brasil a maior região produtora de feijão-fava, com 19.067 toneladas representando mais de 90% do total produzido no país (IBGE, 2017).

A relevância econômica e social do feijão-fava no nordeste se deve principalmente a sua rusticidade e boa adaptação, em comparação ao feijão-comum e outras espécies, às condições semiáridas e de ecossistemas fragilizados como os que incidem na região (FOFANA et al., 1997), o que possibilita prolongar a colheita em período seco e consórcio com milho, mandioca e mamona.

A cultura do feijão-fava é, portanto, uma expressiva alternativa de renda e alimento, principalmente para pequenos produtores que dispõem de baixo nível tecnológico, fato que ressalta a importância do desenvolvimento de biotecnologias rentáveis e viáveis tanto economicamente quanto ambientalmente - a exemplo de inoculantes selecionados para outras espécies - visando difusão e incremento na cultura (SANTOS et al., 2011; COSTA et al., 2017).

## 2.6 Simbiose entre feijão-fava e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas

O feijão-fava, assim como outras espécies da família Leguminosae, é capaz de se beneficiar do processo de FBN para sua nutrição e desenvolvimento por apresentar a importante característica de estabelecer simbiose com BFNNL (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2006; ANTUNES et al., 2011; MATSUBARA; ZÚÑIGA-DÁVILA, 2015).

Tal fato permite que o manejo da cultura possa ser aprimorado, de forma a incrementar a produtividade de maneira econômica e sustentável através da seleção de BFNNL para o feijão-fava, identificando o melhor par simbiótico para recomendação como inoculante. Contudo, as informações agronômicas e genéticas dessa simbiose são incipientes e têm sido pouco investigadas.

No Brasil, existem apenas seis estudos sobre a relação simbiótica entre estirpes de BFNNL e o feijão-fava. Nestes, Antunes et al., (2011) avaliaram a eficiência simbiótica de isolados nativos de duas áreas produtoras de feijão-fava do estado do Piauí em condições axênicas (vasos de Leonard), com algumas estirpes exibindo bons resultados na nutrição nitrogenada da cultura, porém sem identificá-las geneticamente, assim como Amorim et al., (2019) que apenas caracterizaram morfológicamente e fisiologicamente estirpes isoladas de feijão-fava cultivado em vasos com solos advindos de áreas produtoras da cultura em três estados nordestinos, sem avaliar a eficiência simbiótica.

Santos et al., (2011) e Araújo et al., (2015) conduziram experimentos utilizando vasos com solo em casa de vegetação, e dos isolados de nódulos de feijão-fava avaliaram a diversidade genética (Tabela 1), sendo que os resultados apresentaram predominância para o gênero *Bradyrhizobium*. Costa et al., (2017) avaliaram a eficiência simbiótica de 17 estirpes isoladas de sete espécies leguminosas originadas de diferentes regiões do Brasil em diversos sistemas de uso, nas condições axênicas e em vasos com solo, e como estas se comportam na presença de correção do pH, sendo as duas estirpes que exibiram melhores resultados tanto em condições axênicas como em vasos com solo [INPA54B e INPA86A isoladas de *Inga* sp. e *Swartzia* sp. na Amazônia, respectivamente (MOREIRA et al., 1993)] pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, e sem efeito da calagem na nodulação e desenvolvimento do feijão-fava.

Já em Costa Neto et al., (2017) foi avaliado em condições axênicas a eficiência simbiótica de isolados obtidos de nódulos de feijão-fava - caracterizados geneticamente em Araújo et al., (2015) (Tabela 1) - em duas cultivares da cultura em vasos com solo advindo de área em que anteriormente havia sido realizado plantio da espécie. Não foi observado

diferença no desempenho simbiótico entre as cultivares, com destaque para o gênero *Bradyrhizobium* em termos de eficiência.

**Tabela 1** Caracterização genética de rizóbios isolados de nódulos de feijão-fava no mundo.

Gênero	País	Método	Referência
<i>B. yuanmingense</i> <i>Bradyrhizobium</i> sp.	Perú	16S rRNA e <i>dnaK</i> , <i>nifH</i> , <i>nodB</i>	Ormeño-Orillo <i>et al.</i> , 2006
<i>Bradyrhizobium</i>	México	16S rRNA e <i>recA</i> , <i>nodZ</i> e <i>nifH</i>	López-López <i>et al.</i> , 2013
<i>B. paxllaeri</i> <i>B. icense</i>	Perú	16S rRNA e <i>recA</i> , <i>atpD</i> , <i>glnII</i> , <i>dnaK</i> e <i>gyrB</i>	Durán <i>et al.</i> , 2014
<i>Bradyrhizobium</i> <i>Mesorhizobium</i> <i>Rhizobium</i>	Brasil	Endonucleases <i>MboI</i> , <i>HaeIII</i> , e <i>NheI</i>	Santos <i>et al.</i> , 2011
<i>B. yuanmyrense</i> <i>B. liaoningense</i> <i>B. paxllaeri</i> <i>B. icense</i> <i>R. mesosinicum</i> <i>R. alamii</i>	Perú	16S rRNA	Matsubara; Zuñiga- Dávila, 2015
<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Allorhizobium</i>	Brasil	16S rRNA	Araújo <i>et al.</i> , 2015

Entre outros aspectos que podem interferir no estabelecimento e eficácia da FBN, está a especificidade hospedeira (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MORA *et al.*, 2014). Em geral, quando esta ocorre, o processo de FBN se dá de forma mais eficaz se comparado às relações simbióticas promíscuas. Estirpes do gênero *Rhizobium* foram encontradas nodulando feijão-fava na América do Sul, porém se mostraram ineficientes no fornecimento de N à cultura na maioria dos casos (ARAÚJO *et al.*, 2015; COSTA NETO *et al.*, 2017).

Quanto à eficiência da simbiose com feijão-fava, o mesmo gênero – *Bradyrhizobium* – é relatado no Brasil (ANTUNES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2017; COSTA NETO *et al.*, 2017) e em outros países como México, Peru e Califórnia (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2013; DURÁN *et al.*, 2014; MATSUBARA; ZUÑIGA-DÁVILA, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2017) como sendo o de maior expressão no processo de FBN. No trabalho de Costa *et al.*, (2017), a estirpe mais eficiente no fornecimento de N às plantas de feijão-fava em comparação as demais estirpes avaliadas, foi a INPA54B (*Bradyrhizobium forestalis*). Tais evidências

indicam que o feijão-fava nodula de forma preferencial e eficaz com estirpes do gênero *Bradyrhizobium*.

Uma grande vantagem desse gênero é que a maioria dos seus genes de nodulação e fixação de N<sub>2</sub> localiza-se no cromossomo (MASTERSON et al., 1985), conferindo-lhe estabilidade genética, sendo esta, extremamente importante nos processos de seleção de BFNNL para determinada cultura para que a eficiência simbiótica se mantenha ao longo dos anos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A exemplo de tal estabilidade genética, ressalta-se a estirpe INPA54B, isolada de *Inga* sp. na Amazônia em 1989 (MOREIRA, 1989 – dados não publicados), identificada como pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* (MOREIRA et al., 1993) e descrita em Costa et al., (2018) como sendo da espécie *Bradyrhizobium forestalis*, a qual mantém sua eficiência no processo de FBN até os dias atuais, como relatado em Costa et al., (2017).

Em meio a uma ampla gama de gêneros nodulíferos, o gênero *Bradyrhizobium* tem se destacado em ecossistemas brasileiros, pois apresenta vasta distribuição geográfica e forma simbiose eficiente com diversas espécies leguminosas de importância agrícola, pastoril e florestal. Estirpes de BFNNL já foram selecionadas e autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes para mais de 90 espécies leguminosas, e dentre essas, mais de 60% possuem estirpes do gênero *Bradyrhizobium* aprovadas como inoculante (Brasil, 2011).

Para o feijão-fava não existem estirpes selecionadas, recomendadas e aprovadas para inoculação na cultura, principalmente devido à escassez de trabalhos que sustentem a recomendação de inoculantes de acordo com os critérios estabelecidos pelo MAPA. Este fato reforça a necessidade de se isolar, caracterizar morfológicamente e geneticamente, avaliar a eficiência em diversas condições e recomendar para aprovação do MAPA estirpes de bactérias capazes de estabelecer uma simbiose efetiva com essa espécie, visando aumento da produtividade, lucratividade, difusão de biotecnologia e sustentabilidade de cultivo.



## REFERÊNCIAS

- ALI, S. F.; RAWAT, L. S.; MEGHVANSI, M. K.; MAHNA, S. K. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.4, p.13-18, 2009 <https://doi.org/10.1.1.507.5708>
- AMORIM, M. R.; SILVA, A. V. C. R.; ANTUNES, J. E. L.; OLIVEIRA, L. M. S.; ARAÚJO, A. S. F. Caracterização de rizóbios noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) em solos de três estados do nordeste brasileiro. **Colloquium Agrariae**, v.15, p.11-20, 2019 <https://doi.org/10.5747/ca.2019.v15.n6.a331>
- ANGHINONI, I. Adubação nitrogenada nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. SANTANA, MBM **Adubação nitrogenada no Brasil**. Ilhéus: CEPLAC/SBCS 1-18, 1986
- ANUÁRIO - OUTLOOK GLOBALFERT - 1º Reporte Anual do Mercado de Fertilizantes, 2020 <https://www.globalfert.com.br/outlook-globalfert/>
- ANTUNES, J. E. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAÚJO, A. S. F.; CARMO, M.; LYRA, C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.751-757, 2011 <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000300011>
- ARAÚJO, A. S. F.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; ANTUNES, J. E. L.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Diversity of native rhizobia nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume Research**, New Delhi, v.38, p.653-657, 2015 <https://doi.org/10.18805/lr.v38i5.5946>
- ARAÚJO, A. S. F.; LOPES, A. C. A.; TERAN, J. C. B. Y.; PALKOVIC, A.; GEPTS, P. Nodulation ability in different genotypes of *Phaseolus lunatus* by rhizobia from California agricultural soils. **Symbiosis**, v.73, p.7-14, 2017 <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0465-0>
- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002 <https://doi.org/10.1128/aem.68.10.4906-4914.2002>
- BAUDOIN, J. P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: Gepts, P. (ed.). **Genetic resources of Phaseolus bean**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, p.393-407, 1988 <https://doi.org/10.1007/978-94-009-2786-5>
- BOUWMAN, A. F.; LEE, D. S.; WAH, A.; DENTENER, F. J.; VANDERHOEK, K. W.; OLIVIER, J. G. J. A global high-resolution emission inventory for ammonia. **Global Biogeochemical Cycles**, v.11, p.561-587, 1997 <https://doi.org/10.1029/97GB02266>
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. **Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011**. Seção 1, 6 N°58 ISSN: 1677-7042 Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/registro-de-produtos-e-estabelecimentos/arquivosrpe/IN132011inoculprotocoloprocfixbiologicadoNemleguminosasalterado3512.pdf>>

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEB, S. GEPTS, P.; VANDERLEY, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil**, v.252, p. 55-128, 2003 <https://doi.org/10.1023/A:1024146710611>

CAICEDO, A.; GAITÁN, E.; DUQUE, M. C.; TORO CHICA, O.; DEBOUCK, D. G.; TOHME, J. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. **Crop Science**, v.39, p.1497-1507, 1999 <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.3951497x>

CASTRO, J. L.; SOUZA, M. G.; RUFINI, M.; GUIMARÃES, A. A.; RODRIGUES, T. L.; MOREIRA, F. M. S. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.41, e.0160525, 2017 <https://dx.doi.org/10.1590/18069657rbc20160525>

CANTARELLA, H. Nitrogênio. p.375-470. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do Solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.1017, 2007. ISBN: 978-85-86504-08-2

CHEL-GUERRERO, L.; DOMÍNGUEZ-MAGAÑA, M.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; DÁVILA-ORTIZ, G.; BETANCUR-ANCONA, D. Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) protein hydrolysates with ACE-I inhibitory activity. **Food Nutrition Sciences**, v.3, p.511-521. 2012 <https://doi.org/10.4236/fns.2012.34072>

COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, J. S.; MOREIRA, F. M. S. Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. **Scientia Agricola**, v.73, p.301-310, 2016 <https://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0294>

COSTA, E. M.; GUIMARÃES, A. A.; CARVALHO, T. S.; RODRIGUES, T. L.; RIBEIRO, P. R. A.; LEBBE, L.; MOREIRA, F. M. S. *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. **Archives of Microbiology**, v.200, p.743-752, 2018 <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1486-2>

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1275-1284, 2013 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>

COSTA, E. M.; RIBEIRO, P. R. A.; LIMA, W.; FARIAS, T. P.; MOREIRA, F. M. S. Lima bean nodulates efficiently with *Bradyrhizobium* strains isolated from diverse legume species. **Symbiosis**, v.73, p.125-133, 2017 <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0473-8>

COSTA NETO, V. P.; MENDES, J. B. S.; ARAÚJO, A. S. F.; ALCANTARA NETO, F.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C. Symbiotic performance, nitrogen flux and growth of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) varieties inoculated with different indigenous strains of rhizobia. **Symbiosis**, v.73, p.117-124, 2017 <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0475-6>

DENISON, R. F.; HARTE, B. L. Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin (Nodule Oximetry and Computer Modeling). **Plant Physiology**, v.107, n.4, p.1355-1364, 1995 <https://doi.org/10.1080/07352688809382257>

DILWORTH, M. J.; RYNNE, F. G.; CASTELLI, J. M.; VIVAS-MARFISI, A. I.; GLENN, A. R. Survival of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. **Microbiology**, v.145, p.1585-1593, 1999 <https://doi.org/10.1099/13500872-145-7-1585>

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, v.210, p.850-852, 1966 <https://doi.org/10.1038/210850a0>

DOBERT, R. C.; BLEVINS, D. G. Effect of seed size and plant growth on nodulation and nodule development in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Plant and Soil**, v.148, p.11-19, 1993 <https://doi.org/10.1007/bf02185380>

DURÁN, D.; REY, L.; MAYO, J.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ORMEÑO-ORRILLO, E. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.2072-2078, 2014 <https://doi.org/10.1099/ijms.0.060426-0>

ESQUIVEL, M.; CASTIÑEIRAS, L.; HAMMER, K. Origin, classification, variation and distribution of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in the light of Cuban material. **Euphytica**, v.49, p.89-97, 1990 <https://doi.org/10.1007/BF00027258>

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVERA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1184-1190, 2009 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000900017>

FOFANA B.; BAUDOIN, J. P.; VEKEMANS X.; DEBOUCK, D. G.; DU JARDIN, P. Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.202-212, 1999 <https://doi.org/10.1007/s001220051059>

FOFANA, B.; VEKEMANS, X.; DU JARDIN, P.; BAUDOIN, J. P. Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.95, p.157-165, 1997 <https://doi.org/10.1023/A:1002910114869>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, Rome, 2009 **The State of Food and Agriculture 2009: Livestock in the Balance**. ISBN: 978-92-5-106215-9

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C.; TSAI, S. M. Nodulação em feijão dos conjuntos gênicos andino e mesoamericano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1145-1150, 2002 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002000800012>

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, E.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal Microbiology**, v.40, p.198-207, 1994  
<https://doi.org/10.1139/m94-033>

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes : Importance and Constraints to Greater Use. **Plant Physiology**, v.131, p.872–877, 2003 <https://doi.org/10.1104/pp.017004>

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORESTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.6726-6733, 2012 <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.45-52, 2000 <https://doi.org/10.1007/s003740050622>

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina, Brasil, Embrapa Soja,. p.80, 2007 (Embrapa Soja. Documentos, 283) ISSN: 1516-781X

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **IBGE 2017**. Censo Agro 2017 – Resultados definitivos. Acesso em 17/05/2020 Disponível em  
 <[https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo\\_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76456](https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76456)>

KEE, E.; GLANCEY, J. L.; WOOTTEN, T. L. The lima bean: a vegetable crop for processing. **HortTechnology**, Alexandria, v.7, p.119-128, 1997  
<https://doi.org/10.21273/HORTTECH.7.2.119>

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 51, n.293, p. 67-82, 2004

LEIGH, G. J. The world's greatest fix: a history of nitrogen and agriculture. **Oxford University Press on Demand**, 2004

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1095-1104, 2005 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005001100007>

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; NEGRETE-YANKELEVICH, S.; ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Native bradyrhizobia from los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (lima bean). **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p.33–38, 2013 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.006>

MACKIE, W.W. Origin dispersal and variability of the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L). **Hilgardia**, v.15, p.1-29, 1943 <https://doi.org/10.3733/hilg.v15n01p001>

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p.319, 1997

MAQUET, A.; VEKEMANS, X. Z.; BAUDOIN, J. P. Phylogenetic study on wild allies of lima bean, *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae), and implications on its origin. **Plant Systematics and Evolution**, v.218, p.43-54, 1999 <https://doi.org/10.1007/BF01087033>

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012 <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1157-z>

MASTERSON, R. V.; PRAKASH, R. K.; ATHERLY, A. G. Conservation of symbiotic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v.163, p.21-26, 1985

MATSUBARA, M.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D. Phenotypic and molecular differences among rhizobia that nodulate *Phaseolus lunatus* in the Supe valley in Peru. **Annals of Microbiology**, v.65, p.1803-1808, 2015 <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1054-9>

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 3. ed., 655p, 1982 <https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2>

MORA, Y.; DÍAZ, R.; VARGAS-LAGUNAS, C.; PERALTA, H.; GUERRERO, G.; AGUILAR, A.; ENCARNACIÓN, S.; GIRARD, L.; MORA, J. Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, p.5644-5654, 2014 <https://doi.org/10.1128/AEM.01491-14>

MOREIRA, F. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**, p.121-150, 1994 ISSN: 0101-9716

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v.16, p.135-146, 1993 [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(11\)80258-4](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(11)80258-4)

MOREIRA F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, p.729, 2006 ISBN: 85-87692-33-X

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (Ed.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, p. 3-8, 2000 <https://doi.org/10.1007/0-306-47615-0>

- OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; MOREIRA, F. M. S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p.948–959, 2013 <https://doi.org/10.5897/ajmr12.1055>
- ORMENÕ-ORRILLO, E.; VINUESA, P.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.253-262, 2006 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.002>
- PEGADO, C. M. A.; BARBOSA, L. J. N.; MENDES, J. E. M. F.; SOUTO, P. C.; SOUTO, J. S. Decomposição superficial e subsuperficial de folhas de fava (*Phaseolus lunatus* L.) na região do brejo da Paraíba, Brasil. **Revista Caatinga**, v.21, p.218-223, 2008 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=237117576031>
- RIBEIRO, P. R. A.; SANTOS, J. V.; COSTA, E. M.; LEBBE, L.; ASSIS, E. S.; OLIVEIRA LOUZADA, M. O.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.212, p.85–93, 2015 <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.06.017>
- RODRIGUES, C. S.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. **Current Microbiology**, v.53, p.1-7, 2006 <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4515-8>
- RUFINI, M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; OLIVEIRA, D. P.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.81-88, 2011 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000100011>
- RUFINI, M.; SILVA, M. A. P.; FERREIRA, P. A. A.; CASSETARI, A. S.; SOARES, B. L.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. **Biology and Fertility of Soils**, v.50, p.115-122, 2014 <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0832-4>
- SANTOS, J. O.; ANTUNES, J. E. L.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. **Annals of Microbiology**, v.61, p.437-444, 2011 <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0156-7>
- SILVA, A. O.; GUIMARÃES, A. A.; COSTA, A. M.; RODRIGUES, T. L.; CARVALHO, T. S.; SALES, F. R.; SOUZA, F. M. S. Plant growth-promoting rhizobacterial communities from an area under the influence of iron mining and from the adjacent phytophysionomies have high genetic diversity. **Land Degradation & Development**, p.1-18, 2020 <https://doi.org/10.1002/ldr.3593>
- SIRAIT, Y.; PILL, W. G.; KEE, W. E. Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) Response to Irrigation Regime and Plant Population Density. **HortScience**, v.29, p.71-73, 1994 <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.29.2.71>

TEIXEIRA, C. M.; CARVALHO, G. J.; SILVA, C. A.; ANDRADE, M. J. B.; PEREIRA, J. M. Liberação de macronutrientes das palhadas de milho, solteiro e consorciado com feijão-de-porco sob cultivo de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, p.497-505, 2010 <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000200023>

United States Department of Agriculture. Crop Production 2018 Summary. National Agricultural Statistics Service, p.129. **USDA 2019**. Acesso em: 17/05/2020 Disponível em < [https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays\\_Reports/reports/cropan19.pdf](https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/cropan19.pdf)>

United States Department of Agriculture: Fertilizer - use and price. **USDA 2020**. Acesso em: 29/03/2020 Disponível em < <http://www.ers.usda.gov/data/fertilizeruse/>>

VARGAS, A. A. T.; GRAHAM, P. H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Research**, v.19, p.91–101, 1988 [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(88\)90047-0](https://doi.org/10.1016/0378-4290(88)90047-0)

WOESE, C. Prokaryote Systematics: Chapter I. The evolution of a science. In: BALOWS, A.; TRÜPPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Editors). **The Prokaryotes – A handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications**. New York, 1991

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

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; ARAÚJO, J. L. S.; FILHO, F. R. F.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas do solo de cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.811-818, 2006 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000500013>

ZORO, B. I.; MAQUET, A.; BAUDOIN, J. P. Population genetic structure of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), with special reference to population sizes. **American Journal of Botany**, v.90, p.897-904, 2003 <https://doi.org/10.3732/ajb.90.6.897>

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO****Diversity and biotechnological potential of rhizobia isolated from lima bean nodules collected at semi-arid region**

Tainara Louzada Rodrigues<sup>1</sup>, Elaine Martins da Costa<sup>2</sup>, Paula Rose de Almeida Ribeiro<sup>1</sup>, Fernanda de Carvalho<sup>1</sup>, Márcia Rufini<sup>1</sup>, Aline Oliveira Silva<sup>1</sup>, Anita Fernanda dos Santos Teixeira<sup>1</sup>, Thiago de Assis Pereira<sup>1</sup>, Flávia Reis Sales<sup>1</sup>, Fatima Maria de Souza Moreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras; <sup>2</sup>Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas

Corresponding author: Fatima Maria de Souza Moreira

E-mail: fmoreira@ufla.br

Telephone: +55 35 3929-1254

O artigo científico se encontra nas normas da revista científica “Agriculture, Ecosystems & Environment”. O mesmo poderá sofrer alterações até a publicação final.



**ABSTRACT:** Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is the second most important species of the *Phaseolus* genus worldwide. In Brazil, it is grown primarily in the Northeast region because of its hardiness under semi-arid conditions. Although lima bean establishes symbiosis with nitrogen-fixing bacteria (NFB), there is not yet an inoculant for use in growing this crop. The aim of this study was to phenotypically and genotypically characterize NFB isolated from root nodules of lima bean collected in the Brazilian semi-arid region and to evaluate their efficiency in supplying nitrogen nutrition to the crop under axenic conditions and in a Humic Rhodic Hapludox with and without correction of acidity. Isolation and phenotypic characterization were carried out in solid 79 medium and genotypic characterization by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The symbiotic efficiencies were evaluated in a greenhouse under axenic conditions using seedling plugs containing vermiculite and sand and, afterwards, in pots with non-autoclaved soil with and without liming. Treatments consisted of the strains under evaluation, controls without inoculation (with and without mineral N), and a strain efficient for the crop. In all, 66 strains were isolated from the root nodules. Phenotypic and genotypic diversity were found, with predominance of strains with intermediate growth, an alkalizing effect, and abundant production of gum, belonging to the *Bradyrhizobium* genus. Liming brought about increases in lima bean development as it interacted with some strains. Six strains of the *Bradyrhizobium* genus, belonging to groups of type strains that include *B. elkanii* and *B. japonicum*, stood out for their biotechnological potential as inoculants for lima bean, and they should be tested in the field with the aim of validating their recommendation as inoculants for that crop.

**Keywords:** *Bradyrhizobium*. Liming. Biological nitrogen fixation. Inoculant. *Phaseolus lunatus*. 16S rRNA gene.

## 1. Introduction

Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.), also known as butter bean, belongs to the Leguminosae family and is grown in North and South America, Europe, Africa, and Asia. Among the species of the *Phaseolus* genus, lima bean is one of five that are cropped, and it is the second most important species in economic terms (Fofana et al., 1999). It reduces dependence on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.), with consequent support of food security for an increasing world population projected to reach nine billion people in 2050 (FAO 2017).

On a global scale, the United States is one of the countries that is most prominent in lima bean production, exceeding planted area of 21 thousand hectares and yield of 1000 kilograms per hectare, with consumption preferentially in the green stage (Sirait et al., 1994; Kee et al., 1997). In Brazil, data of the IBGE (2017) census indicate a mean yield of 517 kilograms per hectare, with more than 90% of production in the Northeast region. The economic and social relevance of lima bean for the region is mainly due to its hardiness and good adaptation to semi-arid conditions and to fragile ecosystems (Fofana et al., 1997), in which it is possible to extend harvest into the dry period and use it in intercropping systems.

The main uses of lima bean are in human and animal diets as a source of plant protein. In addition, it is used as a green manure crop, due to contribution of nitrogen (N), and use as a cover crop for soil protection (Pegado et al., 2008). As lima bean is an expressive food and income alternative, especially for small producers that have a low technological level, the development of profitable and viable biotechnologies with the aim of spreading these technologies and increasing crop yield becomes important both economically and environmentally. Biotechnologies such as inoculants of nitrogen-fixing nodule-forming bacteria in legumes (NFNFB) are already used in other leguminous crops.

Although lima bean has the important characteristic of establishing symbiosis with NFNFB (Ormeño-Orrillo et al., 2006; Araújo et al., 2015; Matsubara and Zúñiga-Dávila 2015; Costa et al., 2017), the phenotypic and genotypic diversity and the symbiotic efficiency of NFNFB isolated from the nodules of this leguminous plant have not been widely studied. Only six studies worldwide have genetically characterized isolates from lima bean nodules (Ormeño-Orrillo et al., 2006; Santos et al., 2011; López-López et al., 2013; Durán et al., 2014; Araújo et al., 2015; Matsubara and Zúñiga-Dávila 2015), and in Brazil, there have been only six studies in relation to symbiosis between rhizobia and lima bean (Antunes et al., 2011; Santos et al., 2011; Araújo et al., 2015; Costa et al., 2017; Costa Neto et al., 2017; Amorim et

al., 2019). This shows the need for more research in this area of study to make the use of this biotechnology possible.

Among the studies carried out, establishment of an effective and preferential symbiosis with *Bradyrhizobium* strains has been observed (Araújo et al., 2017; Costa et al., 2017). This genus has been found in different countries as an effective symbiont in crops of agricultural, livestock, and environmental interest (Law et al., 2007; Guimarães et al., 2012; Rufini et al., 2014; Sá et al., 2019; Costa et al., 2020). A big advantage of this genus is that most of its nodulating and N<sub>2</sub>-fixing genes are located in the chromosome, conferring genetic stability (Masterson et al., 1985). This is extremely important so that the strain selected remains efficient in providing N to the plant species throughout the crop period.

The choice of bacteria efficient in biological N<sub>2</sub> fixation (BNF) in crops of agricultural interest, as in the case of lima bean, must consider not only the efficiency of the strains, but also their ability in competing and surviving in the soil, effective nodules, genetic stability, specificity of the host, and fixation in the target species (Lima et al., 2005; Zilli et al., 2006). Other factors, such as macro- and microsymbiont genetic characteristics, acidity, and availability of nutrients in the soil may also affect nodulation and the BNF process (Hartwig 1998; Bonilla and Bolaños 2009; Moreira et al., 2010; Rufini et al., 2011; Costa et al., 2017).

For lima bean, there are no strains recommended and approved for inoculation, mainly due to the absence of studies on the crop that include all the processes necessary for development of an inoculant. This scenario reinforces the need to isolate, characterize, evaluate efficiency, and select bacteria capable of establishing efficient symbiosis with this species, aiming to increase yield, crop sustainability, and profitability, so that this important biotechnology is disseminated, especially among small producers.

Costa et al., (2017) found strains efficient in lima bean under axenic and non-axenic conditions, however, the strains originated from other plant species in the regions of the Amazon, Minas Gerais, and the *Cerrado* (Brazilian tropical savanna) of Piauí. Araújo et al., (2015) characterized strains isolated from two soils growing lima bean, but they did not evaluate their symbiotic efficiency. The present study not only isolated the strains from the root nodules of lima bean grown in the field in a region of high production of the species in the Brazilian semi-arid region, but also characterized and evaluated their symbiotic efficiency in the crop under axenic conditions and pots with soil with and without liming.

Therefore, the aim of this study was to phenotypically and genotypically characterize N<sub>2</sub>-fixing bacteria isolated from lima bean root nodules and evaluate their efficiency in

supplying N to the crop under axenic conditions and in Humic Rhodic Hapludox soil with and without correction of soil acidity.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Collection of nodules and description of the growing area**

In January 2015, root nodules were collected in the field from ten lima bean plants in bloom, since this is the stage of greatest activity of biological nitrogen fixation. Ten root nodules per plant, chosen at random, were collected, stored in hermetically sealed bottles containing silica gel and cotton, and taken to the Laboratory of Soil Biology, Microbiology, and Biological Processes of the Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil.

The lima bean plants used for collection of the nodules were in an intercropping system with maize in the Primavera community (8°55'9.18''S; 44°9'45.10''W) in the municipality of Santa Luz, Piauí, Brazil. The area had no history of application of chemical fertilizers, soil amendments, or microbial inoculants, and it exhibited the following results for chemical and physical analyses: pH 8.0, P 26.2 mg dm<sup>-3</sup>, K 267.60 mg dm<sup>-3</sup>, Na 3.83 mg dm<sup>-3</sup>, Ca 3.50 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, Mg 0.50 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, Al 0.00 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, H+Al 0.76 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, SB 4.69 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, t 4.69 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, T 5.45 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, V 85.98%, m 0.00%, OM 131 g kg<sup>-1</sup>, Zn 3.04 mg dm<sup>-3</sup>, Fe 10.62 mg dm<sup>-3</sup>, Mn 112.58 mg dm<sup>-3</sup>, Cu 1.06 mg dm<sup>-3</sup>, B 0.50 mg dm<sup>-3</sup>, S 5.30 mg dm<sup>-3</sup>, P rem 48.65 mg L<sup>-1</sup>, sand 860 g kg<sup>-1</sup>, silt 20 g kg<sup>-1</sup>, and clay 120 g kg<sup>-1</sup>.

### **2.2 Isolation and phenotypic and genotypic characterization of the strains**

Phenotypic characterization and partial sequencing of the 16S rRNA gene was carried out by selecting six nodules from each plant (for a total of 60 nodules) for isolation of the bacteria in Petri dishes containing solid 79 medium (Fred and Waksman 1928) with addition of the bromothymol blue indicator.

The nodules were hydrated for 30 minutes, then disinfected through immersion in 98% ethyl alcohol for 30 seconds and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 3 minutes, and washed six times in succession in autoclaved distilled water. In a laminar flow hood, the disinfected nodules were macerated in Petri dishes containing solid 79 culture medium, and the extracted material was spread in the form of compound streaks to obtain isolated colonies. The dishes were incubated at 28°C until the colonies appeared.

After successive transfers/subculturing to obtain pure cultures, the strains were characterized phenotypically, analyzing time of growth [rapid (up to 3 days), intermediate (4-

5 days), and slow (6-9 days)], change in pH of the medium indicated by bromothymol blue [alkalinizing strain (change of color of the culture medium to blue), acidifying strain (change of color of the culture medium to yellow), neutral strain (without change in color of the culture medium, remaining green)], color of the colony, and gum production (abundant, moderate, or scarce).

Partial sequencing of the 16S rRNA gene of 64 strains isolated from the lima bean nodules was performed for genotypic characterization, using DNA extraction by alkaline lysis (Niemann et al., 1997). The 16S rRNA gene was amplified as described in Silva et al., (2020), using the primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane 1991). The quality of the sequences was evaluated by the BioNumerics 7.5 program (Applied Maths, Austin, Texas) and then by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program for comparison with the sequences of type strains deposited in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The sequences determined in this study were deposited in the GenBank (accession numbers are shown in Table 1).

### **2.3 Authentication experiments and evaluation of symbiotic efficiency under axenic conditions**

Authentication and symbiotic efficiency under axenic conditions were evaluated in two different experiments due to the number of isolates, using the same standards and methods. Trial 1 occurred from July to September 2015, and Trial 2 from October to December of the same year, both conducted for 50 days, a period sufficient to authenticate and evaluate symbiotic efficiency since lima bean begins to bloom at around 40 days after sowing.

The experiments were set up in a greenhouse at UFLA using 250 cm<sup>3</sup> non-toxic polypropylene seedling plugs containing vermiculite and sand in the proportion of 2:1, autoclaved under pressure of 1.5 kg cm<sup>-2</sup> at 127°C for one hour, as a substrate for planting. The mean temperatures registered by the Principal Climatological Station of Lavras (21°14'S, 45°00'W) in the months of conducting the experiments were 18.75°C and 23.35°C in Trial 1 and Trial 2, respectively.

Trial 1 consisted of 43 treatments and Trial 2 of 29 treatments, which were composed of the strains obtained from isolations from the root nodules of lima bean (40 strains in Trial 1 and 26 strains in Trial 2), a positive control [INPA54B - *Bradyrhizobium forestalis* – Costa et al., (2018)] with proven symbiotic efficiency in lima bean, both under axenic conditions and

in soil (Costa et al., 2017), and two non-inoculated negative controls, one containing a high concentration of mineral N (HN) ( $52.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) and the other containing a low concentration of mineral N (LN) ( $5.25 \text{ mg L}^{-1}$ ) to monitor possible contamination and for purposes of comparison with the other treatments. A completely randomized statistical design was used, with three replications.

Inoculants were prepared in an axenic manner, consisting of transferring them as cultured in solid 79 medium to glass bottles containing 12 mL of liquid 79 medium, which were then shaken at 120 rpm on a benchtop orbital shaker at  $28^{\circ}\text{C}$ , according to the date planned for inoculation, considering the growth time of the isolates. At the time of sowing, the lima bean seeds (Boca-de-moça variety) were disinfected according to the method used by Vincent (1970), and inoculated, according to the treatment, with 1 mL of the prepared material.

During the period of conducting the experiment, the lima bean plants were irrigated periodically with autoclaved Hoagland and Arnon (1950) nutrient solution; the inoculated treatments and the LN treatment were irrigated with solution at the concentration of  $5.25 \text{ mg L}^{-1}$  of mineral N, and the HN treatment was irrigated with solution at the concentration of  $52.25 \text{ mg L}^{-1}$  of mineral N.

At 50 days after setting up the trials, the following variables were evaluated: number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM), efficiency relative to the HN control (RE), SPAD index (indirect measurement of the chlorophyll content) (SPAD), shoot N content (SNC), and shoot N accumulation (SNA).

The nodules, roots, and shoots were placed in a forced air circulation laboratory oven at  $60^{\circ}\text{C}$  until obtaining constant weight, subsequently checked on an analytical balance. The TDM was calculated by the sum of the SDM and RDM for each treatment. The RE was calculated in relation to production of SDM of the control treatment that received high concentration of mineral N, using the following equation:  $\text{RE} = (\text{SDM of treatment} \times 100) \div \text{SDM of HN treatment}$ .

The SNC was evaluated by the semi-micro Kjeldahl method, according to Sarruge and Haag (1979), determining the percentage of N in the shoot sample that was dried and ground for each treatment. The SNA was calculated by the following equation:  $\text{SNA} = (\text{SDM} \times \text{SNC}) \div 100$ . The SPAD index was obtained through the Konica Minolta SPAD 502 chlorophyll meter, performing 15 readings on the last completely developed three-leaflet leaf nearest the tip of the plant, determining the mean value of the values obtained.

Analysis of variance was performed on all the data of the trials, using the statistical analysis software Sisvar 4.0 (Ferreira, 2011). The effects of the treatments were compared by the Scott-Knott test at 5% probability. Normality was tested on the R statistical software, and to meet the presuppositions of homogeneity of variances, the data for the variables NN, NDM, RDM, and RE of Trial 1, and the data for the variables NN, NDM, RDM, RE, and SPAD of Trial 2 were subsequently transformed by the formula  $(x + 1)^{0.5}$

## 2.4 Evaluation of symbiotic efficiency under non-axenic conditions

The experiment for evaluation of symbiotic efficiency under non-axenic conditions was conducted in a greenhouse at UFLA from August to November 2016, over a total of 73 days. Non-toxic polypropylene pots of 3 dm<sup>-3</sup> capacity were used, containing non-autoclaved soil as a substrate.

The soil used to establish lima bean was a Humic Rhodic Hapludox of known chemical and physical characteristics (pH 5.0, P 0.63 mg dm<sup>-3</sup>, K 41.79 mg dm<sup>-3</sup>, Na 6.19 mg dm<sup>-3</sup>, Ca 0.40 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, Mg 0.20 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, Al 0.70 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, H+Al 8.60 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, SB 0.71 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, t 1.41 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, T 9.31 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, V 7.60 %, m 49.65 %, OM 350 g kg<sup>-1</sup>, Zn 0.86 mg dm<sup>-3</sup>, Fe 181.16 mg dm<sup>-3</sup>, Mn 6.55 mg dm<sup>-3</sup>, Cu 1.76 mg dm<sup>-3</sup>, B 0.27 mg dm<sup>-3</sup>, S 4.72 mg dm<sup>-3</sup>, P rem 8.52 mg L<sup>-1</sup>, sand 260 g kg<sup>-1</sup>, silt 80 g kg<sup>-1</sup>, and clay 660 g kg<sup>-1</sup>), collected in an area of native forest located on the campus of UFLA (21°13'40.9''S, 44°57'58.4''W) at the depth of 0 to 20 cm, dried in the air, homogenized, and passed through a 4 mm sieve.

A randomized block statistical design was used, with four replications, and a 2 × 12 factorial arrangement, constituted by soil with and without liming and twelve sources of N as follows: eight strains that had the best results for SDM and SNA in the axenic trials and that had already been genetically identified at the time of their definition (UFLA02-195, UFLA02-199, UFLA02-206, UFLA02-221, UFLA02-222, UFLA02-242, UFLA02-244, UFLA02-245); one strain that nodulated in the axenic trial but exhibited low symbiotic efficiency, so as to analyze its performance under non-axenic conditions (UFLA02-207); the strain INPA54B (*Bradyrhizobium forestalis*), with proven efficiency in lima bean (Costa et al., 2017); and two non-inoculated treatments, one that did not receive mineral nitrogen fertilization (WoN) and another with mineral nitrogen fertilization (WN).

The amount of limestone to apply was calculated according to the base saturation method (Alvarez and Ribeiro 1999) to raise the base saturation level of the soil to 60% in the treatments with liming. Fertilization was carried out in solution form in all the pots based on

the results of soil chemical analysis using the following recommendations for pots from Malavolta et al. (1980) as a standard: 300 mg dm<sup>-3</sup> of K via KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in three parcels, 100 mg dm<sup>-3</sup> applied at sowing and 200 mg dm<sup>-3</sup> divided into two topdressings at 12 and 24 days after emergence; 40 mg dm<sup>-3</sup> of S via K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.8 mg dm<sup>-3</sup> of B via H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1.5 mg dm<sup>-3</sup> of Cu via CuSO<sub>4</sub>; 3.6 mg dm<sup>-3</sup> of Mn via MnSO<sub>4</sub>; 5.0 mg dm<sup>-3</sup> of Zn via ZnSO<sub>4</sub>; 0.15 mg dm<sup>-3</sup> of Mo via (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>7</sub>; and 300 mg dm<sup>-3</sup> of P using powdered triple superphosphate fertilizer. The pots of the WN control were fertilized with 300 mg dm<sup>-3</sup> of N using the source NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, in three parcels as for K.

The amount of limestone recommended for each pot (1.83 g of MgCO<sub>3</sub> + 5.49 g of CaCO<sub>3</sub>) was mixed homogeneously in the soil, that was maintained at field capacity for reaction over 60 days. Calculation of field capacity was based on moisture of 60% of the total pore volume of the soil, resulting in the volume of 700 mL of water to be added to each pot containing the dry soil.

Inoculants were prepared following the same methods used in the axenic experiments, according to the growing time of the strains. At the time of sowing, the four lima bean (Bocade-moça variety) seeds sown per pot were inoculated (except for the WoN and WN treatments) with 1 mL of the prepared material. After emergence, the plants were thinned, leaving one seedling per pot.

Upon attaining 50% of plants in bloom, the relative chlorophyll index (SPAD) was ascertained and then plants were collected for determination of number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM), efficiency in relation to WN (RE), shoot N content (SNC), and shoot N accumulation (SNA), according to the method described in the axenic trials.

Analysis of variance was performed on all the data through use of the statistical analysis software Sisvar 4.0 (Ferreira, 2011). The normality test was performed on the R statistical software, and then the NN and NDM data were transformed to  $\sqrt{(x + 1)}$  and the RE data to  $\log X_{10}$  to meet the presuppositions of homogeneity of the variances. In the event of significant effect of the sources of N, the mean values were clustered by the Scott-Knott test at the level of 5% probability. The levels of soil acidity correction were compared by the F test. Pearson correlation ( $p \leq 0.05\%$ ) was performed for all the variables using the corrplot package (Wei and Simko 2017) through the R 3.6 software (R Core Team, 2019).

## 2.5 Estimate of native rhizobia in the soil



To estimate the most probable number (MPN) of native N<sub>2</sub>-fixing bacteria in the soil used in the non-axenic experiment that were able to nodulate lima bean, an experiment was conducted in a greenhouse at UFLA using 500 mL glass bottles containing autoclaved Hoagland and Arnon (1950) nutrient solution.

The lima bean seeds (Boca-de-moça variety) were disinfected as in the axenic experiments, pre-germinated in Petri dishes, and inserted in bottles containing solution with low N content (5.25 mg L<sup>-1</sup>) and two strips of filter paper as a support, which also allow the solution to arrive at the radicle. The seeds were inoculated in triplicate with 1 mL of the soil suspensions in saline solution (0.85%) through serial dilutions from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-6</sup>.

The following control treatments not inoculated with the soil suspensions were inserted for detection of possible contamination/error: negative controls with the nutrient solution containing high N content (52.25 mg L<sup>-1</sup>) and low N content, as well as a positive control inoculated with the strain with proven nodulation in lima bean (INPA54B - *Bradyrhizobium forestalis*).

On the 35th day after setting up the experiment, the MPN of native N<sub>2</sub>-fixing bacteria was estimated considering the presence or absence of nodules in each dilution according to Cochran (1950).

### 3. Results

#### 3.1 Phenotypic and genotypic characteristics of the isolated strains

Eleven culture groups were obtained (Fig. S1) based on growing time, change in pH of the culture medium, and gum production of the 66 strains isolated from the lima bean root nodules. In relation to growing time, 18% of the strains had rapid growth (2 to 3 days), 61% had intermediate growth (5 days), and 21% had slow growth (6 days). In regard to pH of the culture medium, 85% of the strains were alkalizing, detected by blue color of the culture medium, 14% acidifying, leaving the culture medium yellow, and only one strain was neutral, with the culture medium remaining green. All the bacteria that had intermediate growth were alkalizing and of cream color, most of them with abundant gum production.

Partial sequencing of the 16S rRNA gene was performed for 64 strains isolated from lima bean nodules. The sequences were compared to the sequences of the GenBank (NCBI) database, with similarities that ranged from 98.26% to 100%, and they showed genetic similarity to seven genera (Tables 1 and 2; Fig. 1): *Bradyrhizobium* (44 isolates), *Rhizobium*

(6 isolates), *Paraburkholderia* (1 isolate), *Brevibacillus* (6 isolates), *Paenibacillus* (4 isolates), *Bacillus* (2 isolates), and *Inquilinus* (1 isolate).

The strains corresponding to the *Bradyrhizobium* genus exhibited intermediate (5 days) and slow (6 days) growth; they alkalinized the culture medium; and their colonies had a cream color. Regarding color of the colonies, 92% of the strains had cream color, and 8% had yellow color; the latter were representatives of the *Paenibacillus* and *Rhizobium* genera (though the *Rhizobium* genus also had strains of cream color). For gum production, 41% of the strains had abundant production, 42% moderate production, and 17% scarce production; the *Bradyrhizobium* genus was the most numerous for the three levels.

### 3.2 Symbiotic efficiency under axenic conditions

#### 3.2.1 Trial 1

All the strains inoculated were able to nodulate lima bean (Table S1). Of these strains, 78% were superior for the NN variable compared to the INPA54B strain, which has proven symbiotic efficiency in lima bean (Costa et al., 2017). The strains UFLA02-202, UFLA02-211, UFLA02-230, and UFLA02-231 exhibited performance superior to INPA54B for NDM, while another 43% of the strains were similar to INPA54B.

In relation to SDM, the strains UFLA02-242 and UFLA02-244 had better performance, matching the HN treatment. Among the other strains in the selection phase, 26% were better than the INPA54B, which was similar (together with the other strains) to the LN treatment. For TDM, the HN treatment had the best response of all.

The strains UFLA02-222, UFLA02-242, and UFLA02-244 had performance similar to the HN treatment for the RE variable, indicating that they are effective in supplying N to lima bean, especially UFLA02-244, which had efficiency greater than 95%. For the SNC variable, nearly all the strains were similar to INPA54B and higher than the HN treatment. The sole exceptions were the strains UFLA02-213 and UFLA02-231; even though they were inferior to the treatments cited, they were similar to the HN treatment and exceeded the LN treatment.

The results observed for SNA of lima bean showed that 32% of the strains were superior and 63% were similar to INPA54B and to the HN treatment (Fig. 2), indicating that they have satisfactory capacity for nitrogen nutrition of the crop under the trial conditions.

#### 3.2.2 Trial 2

In Trial 2, of the 26 strains inoculated originating from isolation of the nodules, 18 were able to nodulate lima bean (Table S2). The strains UFLA02-266, UFLA02-221, UFLA02-195, UFLA02-224, and UFLA02-227 were similar to INPA54B, providing greater NN than the other treatments. These same strains, along with another nine, were also statistically equal to INPA54B for NDM.

For SDM, 46% of the strains, together with the HN treatment, exhibited a better response, indicating their high capacity in providing N to the lima bean plants. The other strains (54%) exhibited the same performance as INPA54B, and they were equal to the LN treatment. The same strains that stood out in SDM production exhibited RE superior to the other treatments, even greater than the performance of INPA54B, matching the HN treatment.

Just as in Trial 1, the HN treatment induced a greater RDM value, and six strains showed the same performance, exceeding the other strains that, together with INPA54B, were equal to the LN treatment. For TDM, the UFLA02-203 strain had a result similar to the HN treatment, which, together with another 11 strains, exceeded INPA54B. For SPAD, the strains UFLA02-195, UFLA02-203, UFLA02-204, UFLA02-216, UFLA02-219, UFLA02-221, UFLA02-224, UFLA02-228, and UFLA02-238 were superior to INPA54B and to the HN treatment. The latter treatments were similar to the strains UFLA02-201, UFLA02-212, UFLA02-227, and UFLA02-266, proving to be superior to the LN treatment and to the other strains.

For the SNC variable, the strains UFLA02-216, UFLA02-219, UFLA02-221, UFLA02-224, UFLA02-227, UFLA02-228, and UFLA02-266 were superior to the other treatments, followed by the strains UFLA02-195, UFLA02-203, UFLA02-204, and UFLA02-238, which were similar to INPA54B and to the HN treatment. For SNA, the strains UFLA02-216, UFLA02-219, UFLA02-221, and UFLA02-228 were equal to the HN treatment and superior to the other treatments, followed by the strains UFLA02-195, UFLA02-203, UFLA02-224, UFLA02-227, and UFLA02-266, which exhibited better results in relation to the rest of the treatments, including INPA54B (Fig. 3).

### **3.3 Symbiotic efficiency under non-axenic conditions**

There was significant interaction between the sources of N and soil acidity correction concerning NN, NDM, SPAD, and SNC (Table S3). In general, the inoculated treatments had a greater concentration of nodules in the root collar region of the plant, indicating that they come from inoculation. For the different sources of N, the highest mean values of SDM,

TDM, and RE occurred in the WN treatment (Table 3). The WoN treatment exhibited higher RDM at the expense of the shoots.

The strains UFLA02-195, UFLA02-199, UFLA02-206, UFLA02-221, UFLA02-222, UFLA02-244, and UFLA02-245 exhibited efficiency in N<sub>2</sub> fixation, comparable to that of the INPA54B strain, producing high SDM, and they also accumulated N in an amount equivalent to that of the WN treatment. In addition, they exceeded the mean values of the WoN control (Table 3). For SNA, most of the strains (except for UFLA02-207 and UFLA02-242) were similar to WN and to INPA54B.

Liming led to increases in all the variables analyzed (Tables 3 and 4), except for RDM. In fact, although soil acidity correction modified the effects of the treatments concerning NN, NDM, SPAD, and SNC, most of the strains in the selection phase proved to be indifferent to liming. Such is the case of the strains UFLA02-195, UFLA02-199, UFLA02-206, UFLA02-221, UFLA02-222, UFLA02-244, UFLA02-245, and INPA54B, with values that are relatively close for NDM and SNC at both levels of soil acidity correction (Table 4). For its part, the UFLA02-242 strain exhibited better performance in regard to SNC when liming was not performed; that is, under conditions of soil acidity, the strain fixed more N<sub>2</sub> (Table 4). However, possibly due to restrictions to plant development in the soil without acidity correction (low SDM production), the SNA was inferior to that provided by the other strains (Table 3).

The performance of the strains UFLA02-207 and UFLA02-242 were inferior to that of the other strains evaluated for SDM, RE, and SNA (Table 3), coinciding with those of the native soil community (WoN) – estimated in the MPN trial at 90 cells per gram of soil. Through insufficiency in supplying N to lima bean, therefore, neither of the strains provide good genetic resources for inoculation in this crop and, for that reason, should not proceed to field tests. The UFLA02-207 strain maintained its low efficiency from the time of the axenic trial.

The Pearson correlation ( $p \leq 0.05$ ) in the soil without liming (Fig. 4), shows that there was correlation between NN and NDM, and these variables were also correlated with SPAD, SNC, and SNA. Furthermore, SNA correlated with SDM, SPAD, RE, and SNC. The RE correlated with SDM and TDM. In the soil with liming, the RE correlated with SDM, RDM, and TDM. The SNA correlated especially with SDM, TDM, RE, and SNC.

Most of the efficient strains tested under non-axenic conditions belong to the group of type strains that contains that of *Bradyrhizobium elkanii*, except for UFLA02-244, which belongs to the group of type strains that contains that of *Bradyrhizobium japonicum*, as well

as INPA54B. This was shown both in the tree constructed based on contigs with 650 base pairs (bp) of 26 strains (Fig. 1, Table 2) and in the tree constructed with the forward + contig sequences with 300 pb of 51 strains (Fig. S1, Table S4). However, strains that were not very efficient or inefficient were also found in both groups.

#### 4. Discussion

The phenotypic and genotypic characterizations of the strains indicate diversity, with predominance of strains with intermediate to slow growth. The *Bradyrhizobium* genus was predominant (Table 1; Fig. 1), with percentage of similarity of the 16S rRNA gene sequences ranging from 99.66% to 100%. In regard to efficiency of symbiosis, the *Bradyrhizobium* genus is reported in Brazil (Antunes et al., 2011; Costa et al., 2017; Costa Neto et al., 2017) and in other countries, such as Mexico, Peru, and the United States (López-López et al., 2013; Durán et al., 2014; Matsubara; Zúñiga-Dávila, 2015; Araújo et al., 2017), as having greatest expression for lima bean, corroborating the results of the present study and indicating host specificity between the *Bradyrhizobium* genus and this species. In terms of strain selection, this is of utmost importance because most of the genes of nodulation and N<sub>2</sub> fixation of this genus are found in the chromosome (Masterson et al., 1985) and this characteristic allows the genetic stability necessary to maintain the biological process over years of growing.

Strains with high capacity for nodulation in lima bean were found in the axenic trials in the seedling plugs (Tables S1 and S2). The high value of NDM of the strains UFLA02-202, UFLA02-211, UFLA02-230, and UFLA02-231 in the 1st axenic trial indicated the symbiotic potential of these strains with lima bean, since nodule weight is highly correlated with the performance of biological N<sub>2</sub> fixation (Döbereiner 1966; Costa et al., 2017). Considering that SDM is also a good parameter for evaluating the nutritional state of the plants, strains such as UFLA02-242 and UFLA02-244 that showed performance superior to that of INPA54B in Trial 1, and even matched that of the HN treatment, show potential for field tests. Both strains were identified as belonging to the *Bradyrhizobium* genus.

The fact that only 18 of the 26 strains inoculated in Trial 2 brought about nodulation in lima bean can be explained by nodule formation varying in accordance with the genotype of the plants and of the strains involved in this interaction (Moreira and Siqueira 2006). In contrast with Trial 2, where all the strains tested were of the *Bradyrhizobium* genus, in Trial 2, other genera recognized as nodule forming in other plant species were tested, as well as all the strains of genera considered as non-nodule forming that were isolated from the nodules of

lima bean. These strains can colonize the roots of the plants and, in the case of leguminous plants, cohabitate in the nodules together with the nodule-forming  $N_2$ -fixing bacteria. They can thus be isolated after surface disinfection of the nodules, as also reported in Coelho et al. (2018). However, even though they are not nodule forming, they may promote plant growth (Ferreira et al., 2020).

The strains that had low nodulation, together with those that did not nodulate lima bean are mostly of rapid growth and acidify the culture medium, with representatives from the genera *Paraburkholderia*, *Ensifer*, *Inquilingus*, *Rhizobium*, *Brevibacillus*, *Bacillus*, and *Paenibacillus* (Table 1). Although some of these genera have been reported as nodule-forming plant growth promoters (*Paraburkholderia*, *Ensifer*, *Rhizobium*) and the others as endophytic non-nodule forming (*Brevibacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Inquilingus*) (Ahmad et al., 2016; Angus et al., 2013; Armanhi et al., 2018; Deng et al., 2011), some strains when inoculated in lima bean had inconsistent results, that is, nodule-forming strains that did not nodulate, which strengthens the hypothesis that this plant species has a high symbiotic specificity with the *Bradyrhizobium* genus. Nevertheless, even some strains of the *Bradyrhizobium* genus did not nodulate in Trial 2, which may also have been due to higher temperature when the experiment was conducted. Nodulation by non-nodule-forming genera already reported by other authors (Lima et al., 2009; Guimarães et al., 2012; Benata et al., 2008; Rangel et al., 2017) may be due to horizontal transfer of symbiotic genes, but this needs to be confirmed.

In general, in the two trials under axenic conditions, the inoculated treatments mostly had lower RDM and SDM in relation to the HN treatment. Consequently, the same occurred for TDM. This may have resulted from the fact that when the plant finds a readily available nutrient source, it takes it up with less energy expenditure, which generates faster and more effective results compared to biologically available N sources in the same space of time. The effect of inoculation of strains that fit in this case could be equal to or exceed the HN treatment for such variables if there were a longer period for conducting the experiment so that the symbiotic relationship had sufficient time to convert the assimilated N into root and shoot dry matter.

The indirect chlorophyll readings (SPAD) were mostly near 40 in Trial 1 and therefore within the range expected for plants with good N nutrition (Silveira et al., 2003). This indicates that most of the strains inoculated were efficient in supplying the nutrient to the plants, and 30 strains inoculated were equal to INPA54B and, together with it, were superior to the HN and LN treatments. The same situation did not occur for SPAD in axenic Trial 2, in

which the readings in general were lower than 40. These results show the efficiency of indirect measurement of chlorophyll activity as a good indicator of biological N<sub>2</sub> fixation in leguminous plants (Silva et al., 2020).

The results observed for SNA of lima bean in axenic Trial 1 indicate that all the strains, except for UFLA02-213 and UFLA02-259, have satisfactory capacity for supplying N to the crop; 13 strains were superior to INPA54B and to the HN treatment, and 25 strains had performance equal to that of these treatments. The results of the INPA54B strain corroborate those found in Costa et al. (2017), who evaluated its symbiotic efficiency in Leonard jars and in an Oxisol. The importance of symbiotic establishment is clear upon observing the treatments that did not show nodulation in axenic Trial 2, which mostly showed results equal to those of the LN treatment, including results for the SNA variable (Fig. 2), which is a good indicator of symbiotic efficiency.

Although the strain UFLA02-207 (*Rhizobium* sp.) nodulated lima bean, it was inefficient in supplying N under both the conditions evaluated. This result corroborates that reported by Costa Neto et al. (2017), in which strains of this genus likewise did not supply N to the crop in a satisfactory manner.

In the non-axenic experiment in soil pots, the greater growth obtained by the WN treatment may have resulted from the ready availability of the N of the mineral source. The higher RDM exhibited in the control without nitrogen fertilization may indicate that the N limitation stimulated root growth at the expense of shoot growth as a manner of exploiting the soil more in search of this nutrient.

In relation to soil acidity correction, liming provided for increases in all the variables analyzed, except RDM. This result was expected since this practice makes Ca and Mg available and corrects soil pH, which favors the availability of other nutrients to the plants and also contributes to an increase in beneficial microbial communities, bringing about an increase in plant yield.

Nodulation may be impaired under acidic conditions, just as in the soil of the experiment (pH 5.0) (Moreira and Siqueira 2006). It is noteworthy that the inoculated strains isolated from lima bean nodules come from a soil with pH of 8.0 and are therefore adapted to this condition. However, except for the inefficient strain (UFLA02-207), the strains had the same response in relation to nodulation and SNA both in the soil with liming and in the soil without liming. This characteristic of adaptation to a wide range of pH values thus confers an advantage to the strains (Moreira and Siqueira 2006), and this is a desirable attribute for strains used as inoculants. Costa et al. (2017) observed that inoculated lima bean did not

respond to liming. However, the strains tested by these authors predominantly originated from Amazon soils, with low pH, and were thus adapted to that condition.

The strains UFLA02-195, UFLA02-199, UFLA02-206, UFLA02-221, UFLA02-222, UFLA02-244, and UFLA02-245 had good performance in relation to SDM, SPAD, and SNA even in the absence of correction of soil acidity, ensuring the practical viability of their use by lima bean growers, who generally have a low level of technology and investment in inputs in the crop. The results therefore show the potential of these strains as inoculants for providing N to lima bean.

The results of Pearson correlation corroborate what was cited above, suggesting that even under conditions of soil without correction of acidity, biological N<sub>2</sub> fixation is efficient in promoting improvement in agronomic traits of lima bean. Negative correlations were evaluated in the two levels of soil acidity correction between the NN and RDM variables. This may result from the lack of need to use photoassimilates in root formation since the nitrogen nutrition was being supplied in a satisfactory manner via biological fixation in the nodules.

The most efficient strains belong to two (*B. elkanii* and *B. japonicum*) of the seven lines described by Avontuur et al. (2019), who separate type strains of *Bradyrhizobium*. *B. japonicum* also includes INPA54B (Costa et al., 2018), belonging to *B. forestalis*. However, this separation does not consider the efficiency of the strains, since not very efficient and inefficient strains were also part of these groups.

## 5. Conclusion

In soil of the Brazilian semi-arid region with high pH (8.0), lima bean establishes symbiosis with nitrogen-fixing bacteria that have phenotypic and genotypic diversity, but it nodulates preferentially with the *Bradyrhizobium* genus, which also has greater efficiency in the process of biological N<sub>2</sub> fixation.

In general, liming did not affect the nodulation of lima bean by the efficient strains, which showed good performance in soil with pH 5.0.

Liming led to increases in the development of lima bean, and there was interaction with some strains.

The strains UFLA02-199, UFLA02-206, UFLA02-221, UFLA02-222, UFLA02-244, UFLA02-245, and INPA54B, all belonging to groups of genus lines that include the type strains of *B. elkanii* and *B. japonicum*, exhibit biotechnological potential for recommendation as inoculants for lima bean, which must be confirmed under field conditions.



**Acknowledgements**

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (CAPES/PROEX AUXPE 593/2018), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Process: 304527/2016-5; Process: 431504/2016-4), and the Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) (PACCSS/PPGCS—2009–2012) for financial support and for granting scholarships. This research is associated with the Brazilian Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Biodiversidade do Solo (Soil Biodiversity/INCT-CNPq). And anonymous reviewers have provided valuable suggestions and comments and thereby greatly improved this manuscript.

## References

- Alvarez, V.H., Ribeiro, A.C. 1999. Calagem. In: Ribeiro, A.C., Guimarães, P.T.G., Alvarez, V.H. (Eds) Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5<sup>o</sup> Aproximação. Viçosa, MG: CFSEMG, pp.43-60.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Altaf, M.M., Khan, M.S., Shouche, Y.S. 2016. Characterization of *Paenibacillus durus* (PNF16) a new isolate and its synergistic interaction with other isolated rhizobacteria in promoting growth and yield of chickpea. J. Microbiol. Biotech. Food Sci. 5, 345 – 350. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.5.4.345-350>
- Amorim, M.R., Silva, A.V.C.R., Antunes, J.E.L., Oliveira, L.M.S., Araújo, A.S.F. 2019. Caracterização de rizóbios noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) em solos de três estados do Nordeste brasileiro. Col. Agr. 15, 11–20. <https://doi.org/10.5747/ca.2019.v15.n6.a331>
- Angus, A.A., Lee, A., Lum, M.R., Shehayeb, M., Hessabi, R., Fujishige, N.A., Hirsch, A.M. 2013. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting *Betaproteobacterium*, are influenced by environmental factors. Plant and Soil, 369, 543–562. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1590-7>
- Antunes, J.E.L., Gomes, R.L.F., Lopes, A.C.A., Araújo, A.S.F., Carmo, M., Lyra, C.P., Figueiredo, M.V.B. 2011. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbios noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Ver. Bras. Ciênc. Solo. 35, 751-757 <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000300011>
- Araújo, A.S.F., Lopes, A.C.A., Gomes, R.L.F., Beserra Júnior, J.E.A., Antunes, J.E.L., Lyra, M.C.C.P., Figueiredo, M.V.B. 2015. Diversity of native rhizobia nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. Leg. Resear. 38, 653-657. <https://doi.org/10.18805/lr.v38i5.5946>
- Araújo ASF, Teran JCBY, Palkovic A, Gepts P (2017) Nodulation ability in different genotypes of *Phaseolus lunatus* by rhizobia from California agricultural soils. Symbiosis 73:7-14 <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0465-0>
- Armanhi, J.S.L., Souza, R.S.C., Damasceno, N.B., Araújo, L.M., Imperial, J., Arruda, P. 2018. A community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome. Front. Plant. Sci. 8, 2191. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02191>
- Avontuur, J.R., Palmer, M, Beukes, C.W., Chan, W.Y., Coetzee, M.P.A., Blom, J., Stepkowski, T., Kyrpides, N.C., Woyke, T., Shapiro, N., Whitman, W.B., Venter, S.N.,

- Steenkamp, E.T. 2019. Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? *Syst. Appl. Microbiol.* 42, 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.03.006>
- Benata, H., Mohammed, O., Noureddine, B., Abdelbasset, B., Abdelmoumen, H., Muresu, R., Squartini, A., El Idrissi, M.M. 2008. Diversity of bacteria that nodulate *Prosopis juliflora* in the eastern area of Morocco. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.08.002>
- Bonilla, I., Bolaños, L. 2009. Mineral nutrition for legume-rhizobia symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co, and Ni: a review. *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants* 1, 253-274.
- Cochran, W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the “most probable number”, *Biometrics.* 6, 105-116.
- Coelho, K.P., Ribeiro, P.R.A., Moura, E.G., Aguiar, A.C.F., Rodrigues, T.L., Moreira, F.M.S. 2018. Symbiosis of rhizobia with *Gliricidia sepium* and *Clitoria fairchildiana* in an Oxisol in the pre-Amazon region of Maranhão State. *Acta Sci. Agron.* 40, e35248. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.35248>
- Costa, E.M., Ribeiro, P.R.A., Carvalho, T.S., Vicentin, R., Balsanelli, E., Souza, E.M., Lebbe, L., Willems, A., Moreira, F.M.S. 2020. Efficient nitrogen-fixing bacteria isolated from soybean nodules in the semi-arid Region of northeast Brazil are classified as *Bradyrhizobium brasilense* (Symbiovar Sojae). *Curr. Microbiol.* 77, 1746-1755. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01993-6>
- Costa, E.M., Guimarães, A.A., Carvalho, T.S., Rodrigues, T.L., Ribeiro, P.R.A., Lebbe, L., Moreira, F.M.S. 2018. *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Arch. Microbiol.* 200, 743–75. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1486-2>
- Costa, E.M., Ribeiro, P.R.A., Lima, W., Farias, T.P., Moreira, F.M.S. 2017. Lima bean nodulates efficiently with *Bradyrhizobium* strains isolated from diverse legume species. *Symbiosis.* 73, 125-133. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0473-8>
- Costa Neto, V.P., Mendes, J.B.S., Araújo, A.S.F., Alcântara Neto, F., Bonifácio, A., Rodrigues, A.C. 2017. Symbiotic performance, nitrogen flux and growth of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) varieties inoculated with different indigenous strains of rhizobia. *Symbiosis.* 73, 117-124. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0475-6>
- Deng, Z.S., Zhao, L.F., Kong, Z.Y., Yang, W.Q., Lindström, K., Wang, E.T., Wei, G.H. 2011. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 463-475.

- Döbereiner, J. 1966. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature*. 210, 850-852. <https://doi.org/10.1038/210850a0>
- Durán, D., Rey, L., Mayo, J., Zúñiga-Dávila, D., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Martínez-Romero, E., Ormeño-Orrillo, E. 2014. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2072-2078. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.060426-0>
- Ferreira, D.F. 2014. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* 35, 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542011000600001>
- Ferreira, L.V.M., Carvalho, F., Fonseca, J.C.A., Oliveira, D.P., Medeiros, F.H.V., Moreira, F.M.S. 2020. Co-inoculation of selected nodule endophytic rhizobacterial strains with *Rhizobium tropici* promotes plant growth and controls damping off in common bean. *Pedosphere*, 30, 98-108. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60825-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60825-8)
- Fofana, B., Baudoin, J.P., Vekemans, X., Debouck, D.G., Du Jardin, P. 1999. Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.* 98, 202-212. <https://doi.org/10.1007/s001220051059>
- Fofana, B., Vekemans, X., Du Jardin, P., Baudoin, J.P. 1997. Genetic diversity in lima (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica*. 95, 157-165. <https://doi.org/10.1023/A:1002910114869>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, Rome 2017. Pulses and their by-products as animal feed ISBN: 978-92-5-109915-5
- Fred, E.B., Waksman, S.A. 1928. Laboratory manual of general microbiology – with special reference to the microorganisms of the soil. McGraw-Hill Book Company. New York. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6957>
- Guimarães, A.A., Jaramillo, P.M.D., Nóbrega, R.S.A., Florentino, L.A., Silva, K.B., Moreira, F.M.S. 2012. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6726-6733. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>
- Hartwig, U.A. 1998. The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: A conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 1, 92-120.

- Hoagland, D., Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Circular No. 347. University of California, Berkeley, CA.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2017). <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado> (accessed 20 July 2019)
- Kee, E., Glancey, J.L., Wootten, T.L. 1997. The lima bean: a vegetable crop for processing. *Horttechnology*. 7, 119-128. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.7.2.119>
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, England: John Wiley and Sons, pp. 115–175.
- Law, I.J., Botha, W.F., Majaule, U.C., Phalane, F.L. 2007. Symbiotic and genomic diversity of ‘cowpea’ bradyrhizobia from soils in Botswana and South Africa. *Biol. Fertil. Soils*. 43, 653–663.
- Lima, A.S., Nóbrega, R.S.A., Barberi, A., Silva, K., Ferreira, D.F., Moreira, F.M.S. 2009. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil*. 319, 127-145. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9855-2>
- Lima, A.S., Pereira, J.P.A.R., Moreira, F.M.S. 2005. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 40, 1095-1104. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005001100007>
- López-López, A., Negrete-Yankelevich, S., Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. 2013. Native bradyrhizobia from los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (lima bean). *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.006>
- Malavolta, E. 1980. *Elementos de Nutrição Mineral de Plantas*. Ceres, São Paulo.
- Masterson, R.V., Prakash, R.K., Atherly, A.G. 1985. Conservation of symbiotic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 163. 21-26.
- Matsubara, M., Zúñiga-Dávila, D. 2015. Phenotypic and molecular differences among rhizobia that nodulate *Phaseolus lunatus* in the Supe valley in Peru. *Ann. Microbiol.* 65, 1803-1808. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1054-9>
- Moreira, F.M.S., Carvalho, T.S., Siqueira, J.O. 2010. Effect of fertilizers, lime, and inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on the growth of four leguminous tree species in a low-fertility soil. *Biol. Fertil. Soils*. 46, 771-779.

- Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2006. Microbiologia e bioquímica do solo. second ed. Editora UFLA Lavras.
- Niemann, S., Puehler, A., Tichy, H.V., Simon, R., Selbitshka, W. 1997. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. J. Appl. Microbiol. 82, 477–484.
- Ormeño-Orrillo, E., Vinuesa, P., Zúñiga-Dávila, D., Matínez-Romero, E. 2006. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. Syst. Appl. Microbiol. 29, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.002>
- Pegado, C.M.A., Barbosa, L.J.N., Mendes, J.E.M.F., Souto, J.S. 2008. Decomposição superficial e subsuperficial de folhas de fava (*Phaseolus lunatus* L.) na região do brejo da Paraíba, Brasil. Rev. Caatinga. 21, 218-223. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=237117576031>
- R Core Team 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput.
- Rangel, W.M., Thijs, S., Janssen, J., Longatti, S.M.O., Bonaldi, D.S., Ribeiro, P.R.A., Jambon, I., Eevers, N., Weyens, N., Vangronsveld, J., Moreira, F.M.S. 2017. Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. Int. J. Phytoremediation. 19, 142-156. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207600>
- Rufini, M., Ferreira, P.A.A., Soares, B.L., Oliveira, D.P., Andrade, M.J.B., Moreira, F.M.S. 2011. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro comum em diferentes valores de pH. Pesqui. Agropecu. Bras. 46, 81-88. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000100011>
- Rufini, M., Silva, M.A.P., Ferreira, P.A.A., Cassetari, A.S., Soares, B.L., Andrade, M.J.B., Moreira, F.M.S. 2014. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. Biol. Fertil. Soils. 50, 115-122. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0832-4>
- Sá, O.A.A.L., Ribeiro, P.R.A., Rufini, M., Cruvinel, I.A.F., Casagrande, D.R., Moreira, F.M.S. 2019. Microsymbionts of forage peanut under different soil and climate conditions belong to a specific group of *Bradyrhizobium* strains. Appl. Soil Ecol. 143, 201-212.
- Santos, J.O., Antunes, J.E.L., Araújo, A.S.F., Lyra, M.C.C.P., Gomes, R.L.F., Lopes, A.C.A., Figueiredo, M.V.B. 2011. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from

*Phaseolus lunatus*. Ann. Microbiol. 61, 437-444. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0156-7>

Sarruge, J.R., Haag, H.P. 1974. Análise química em plantas. ESALQ/USP, Piracicaba.

Silva, A.O., Guimarães, A.A., Costa, A.M., Rodrigues, T.L., Carvalho, T.S., Sales, F.R., Moreira, F.M.S. 2020. Plant growth-promoting rhizobacterial communities from an área under the influence of iron mining and from the adjacent phytophysiognomies which have high genetic diversity. Land Degrad. 1-18. <https://doi.org/10.1002/ldr.3593>

Silveira, P.M., Braz, A.J.B.P., Didonet, A.D.D. 2003. Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. Pesqui. Agropecu. Bras. 38, 1083-1087.

Sirait, Y., Pill, W.G., Kee, W.E. 1994. Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) response to irrigation regime and plant population density. HortScience. 29, 71-73. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.29.2.71>

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria International biological programme handbook no. 15. Oxford, England: Blackwell Scientific.

Wei, T., Simko, V. 2017. R Package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix

Zilli, J.E., Valicheski, R.R., Rumjanek, N.G., Araújo, J.L.S., Filho, F.R.F., Neves, M.C.P. 2006. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas do solo de cerrado em caupi. Pesqui. Agropecu. Bras. 41, 811-818. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000500013>

## LIST OF TABLES

**Table 1** Phenotypic characterization in solid 79 medium and genotypic characterization through partial sequencing of the 16S rRNA gene of the strains isolated from nodules of lima bean grown in soil in Piauí, Brazil

Strain	Culture characteristics in solid 79 medium <sup>1</sup>				NBP <sup>2</sup>	Most similar sequence found in the GenBank			GenBank deposit code
	Growth	pH	Color of the colony	Gum production		Genus	SI <sup>3</sup> %	Accession number	
UFLA02-195	I	Al	Cream	Ab	297 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.66	NR_159233.1	MG755270
UFLA02-197	R	Al	Cream	Ec	1325 <sup>C</sup>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	99.47	NR_043180.1	MK559018
UFLA02-198	R	Ac	Cream	Md	1312 <sup>C</sup>	<i>Rhizobium</i> sp.	99.76	NR_043180.1	MG755272
UFLA02-199	I	Al	Cream	Ab	737 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_117947.1	MG755273
UFLA02-200	I	Al	Cream	Md.	1266 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.92	NR_043037.1	MG755274
UFLA02-201	R	N	Cream	Ab	1281 <sup>C</sup>	<i>Inquilinus</i> sp.	99.45	NR_112560.1	MG755275
UFLA02-202	I	Al	Cream	Md	1273 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.84	NR_117947.1	MG755276
UFLA02-203	L	Al	Cream	Ec	nd	nd	nd	nd	nd
UFLA02-204	I	Al	Cream	Md	1183 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_137331.1	MK559019
UFLA02-205	I	Al	Cream	Ab	1271 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.92	NR_043037.1	MG755277
UFLA02-206	I	Al	Cream	Ab	1265 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.92	NR_043037.1	MG755278
UFLA02-207	R	Ac	Yellow	Ab	1303 <sup>C</sup>	<i>Rhizobium</i> sp.	99.77	NR_116874.1	MG755279
UFLA02-208	I	Al	Cream	Ec	504 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_137331.1	MG755280
UFLA02-209	I	Al	Cream	Md	1246 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.92	NR_043037.1	MG755281
UFLA02-210	I	Al	Cream	Md	1168 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.92	NR_043037.1	MG755282
UFLA02-211	I	Al	Cream	Md	1252 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.92	NR_043037.1	MG755283
UFLA02-212	R	Al	Cream	Ec	572 <sup>R</sup>	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	NR_113763.1	MK559020
UFLA02-213	I	Al	Cream	Md	465 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_157657.1	MG755284
UFLA02-214	I	Al	Cream	Ab	1220 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.92	NR_043037.1	MG755285
UFLA02-215	I	Al	Cream	Ab	800 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KX683400.1	MG755286
UFLA02-216	I	Al	Cream	Ab	599 <sup>R</sup>	<i>Brevibacillus</i> sp.	99.67	NR_112926.1	MK559021
UFLA02-217	L	Al	Cream	Ec	695 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.71	NR_159233.1	MG755287
UFLA02-218	L	Al	Cream	Md	919 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.46	NR_043037.1	MG755288
UFLA02-219	I	Al	Cream	Ab	586 <sup>R</sup>	<i>Brevibacillus</i> sp.	99.83	NR_113763.1	MK559022



UFLA02-220	I	Al	Cream	Ab	1267 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.84	NR_043037.1	MG755289
UFLA02-221	L	Al	Cream	Md	830 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_159233.1	MG755290
UFLA02-222	I	Al	Cream	Ab	1066 <sup>C</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.92	NR_043037.1	MG755291
UFLA02-223	I	Al	Cream	Md	585 <sup>R</sup>	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	NR_113763.1	MK559023
UFLA02-224	I	Al	Cream	Md	nd	nd	nd	nd	nd
UFLA02-225	R	Ac	Cream	Md	1145 <sup>C</sup>	<i>Bacillus</i> sp.	100	MN543830.1	MG755292
UFLA02-227	I	Al	Cream	Md	1352 <sup>C</sup>	<i>Brevibacillus</i> sp.	98.82	NR_113589.1	MK559024
UFLA02-228	I	Al	Cream	Ab	1142 <sup>C</sup>	<i>Bacillus</i> sp.	99.91	MN543830.1	MK559025
UFLA02-230	I	Al	Cream	Ab	444 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_159233.1	MG755294
UFLA02-231	L	Al	Cream	Md	528 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755295
UFLA02-232	R	Ac	Cream	Md	1265 <sup>C</sup>	<i>Rhizobium</i> sp.	99.76	NR_043548.1	MG755296
UFLA02-233	I	Al	Cream	Ab	506 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755297
UFLA02-235	I	Al	Cream	Ab	580 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_137331.1	MG755299
UFLA02-236	I	Al	Cream	Md	395 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_157657.1	MG755300
UFLA02-237	L	Al	Cream	Md	313 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.68	NR_157657.1	MG755301
UFLA02-238	L	Al	Cream	Md	1310 <sup>C</sup>	<i>Rhizobium</i> sp.	99.92	NR_116874.1	MK559026
UFLA02-239	R	Ac	Yellow	Ec	885 <sup>C</sup>	<i>Paenibacillus</i> sp.	99.19	NR_116564.1	MG755302
UFLA02-240	L	Al	Cream	Ab	475 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755303
UFLA02-241	L	Al	Cream	Md	460 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755304
UFLA02-242	I	Al	Cream	Ab	535 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755305
UFLA02-243	R	Ac	Yellow	Ec	923 <sup>F</sup>	<i>Paenibacillus</i> sp.	98.26	NR_147741.1	MG755306
UFLA02-244	I	Al	Cream	Md	400 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_137331.1	MG755307
UFLA02-245	I	Al	Cream	Ab	547 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755308
UFLA02-246	I	Al	Cream	Ab	632 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.84	KX683400.1	MG755309
UFLA02-247	R	Ac	Yellow	Ec	867 <sup>C</sup>	<i>Paenibacillus</i> sp.	99.19	NR_116564.1	MG755310
UFLA02-249	L	Al	Cream	Md	574 <sup>R</sup>	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	FJ719331.1	MK559027
UFLA02-250	R	Ac	Yellow	Ec	1191 <sup>C</sup>	<i>Paenibacillus</i> sp.	99.19	NR_116564.1	MG755312
UFLA02-252	R	Ac	Cream	Ab	1309 <sup>C</sup>	<i>Rhizobium</i> sp.	99.85	NR_116874.1	MG755314
UFLA02-253	I	Al	Cream	Ab	684 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755315
UFLA02-254	I	Al	Cream	Ab	822 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755316
UFLA02-255	L	Al	Cream	Md	576 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_043037.1	MG755317
UFLA02-256	I	Al	Cream	Md	513 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.81	EU561074.2	MG755318
UFLA02-257	I	Al	Cream	Ab	492 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_043037.1	MG755319
UFLA02-258	I	Al	Cream	Ab	732 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_043037.1	MG755320
UFLA02-259	L	Al	Cream	Ec	416 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_145925.1	MG755321

UFLA02-260	L	Al	Cream	Md	524 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_137331.1	MG755322
UFLA02-261	I	Al	Cream	Md	557 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_137331.1	MG755323
UFLA02-262	I	Al	Cream	Md	512 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755324
UFLA02-263	I	Al	Cream	Ab	394 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX683400.1	MG755325
UFLA02-264	L	Al	Cream	Ec	418 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_137331.1	MG755326
UFLA02-265	I	Al	Cream	Ab	506 <sup>F</sup>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_043037.1	MG755327
UFLA02-266	I	Al	Cream	Md	1288 <sup>C</sup>	<i>Rhizobium</i> sp.	99.84	NR_116874.1	MK559028

<sup>1</sup> R: rapid, I: intermediate, L: slow; N: neutral, Al: alkaline, Ac: acidic; Ab: abundant, Md: moderate, Sc: scarce; <sup>2</sup> NBP: number of base pairs of nucleotides; <sup>F</sup>: forward, <sup>R</sup>: reverse, <sup>C</sup>: contig; <sup>3</sup> SI: percentage of similarity found in the GenBank; nd: not genetically sequenced

**Table 2** Type strains and stains isolated from nodules of *Phaseolus lunatus* L. in the compact groups of the phylogenetic tree presented in Fig. 1, constructed as based on the 16S rRNA gene sequences

Group	Strain
<b>I</b>	UFLA02-200, <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> PAC48 <sup>T</sup> (NR 043037.1), <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76 <sup>T</sup> (NR 117947.1), <i>Bradyrhizobium tropiciagri</i> SEMIA 6148 <sup>T</sup> (NR 145862.1), <i>Bradyrhizobium namibiense</i> 5-10 <sup>T</sup> (NR 159233.1), <i>Bradyrhizobium uaiense</i> UFLA03-164 <sup>T</sup> (KC879705.2), <i>Bradyrhizobium ferriligni</i> CCBAU 51502 <sup>T</sup> (KX683400.1), UFLA02-218, UFLA02-220, UFLA02-222, UFLA02-214, UFLA02-209, UFLA02-211, UFLA02-210, UFLA02-205, UFLA02-206, UFLA02-202, <i>Bradyrhizobium icense</i> LMTR 13 <sup>T</sup> (NR 133707.1)
<b>II</b>	UFLA02-232, <i>Rhizobium viscosum</i> LMG 16473 <sup>T</sup> (NR 042253.1), <i>Rhizobium alamii</i> GBV016 <sup>T</sup> (NR 042687.1), <i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 <sup>T</sup> (NR 043548.1), UFLA02-198, <i>Rhizobium sullae</i> IS 123 <sup>T</sup> (NR 029330.1), <i>Rhizobium gallicum</i> R602sp <sup>T</sup> (NR 036785.1), <i>Rhizobium loessense</i> CCBAU 7190B <sup>T</sup> (NR 028819.1), <i>Rhizobium yanglingense</i> SH22623 <sup>T</sup> (NR 028663.1)
<b>III</b>	UFLA02-197, <i>Paraburkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (NR 043180.1), <i>Paraburkholderia phymatum</i> STM815 <sup>T</sup> (NR 027555.1), <i>Paraburkholderia azotifigens</i> NF2-5-3 <sup>T</sup> (NR 159311.1)
<b>IV</b>	<i>Paenibacillus cellulositrophicus</i> P2-1 <sup>T</sup> (NR 116564.1), <i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 <sup>T</sup> (NR 042189.1), UFLA 02-250, UFLA02-239, UFLA 02-247

**Table 3** Mean values of shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM), efficiency in relation to the control that received high mineral nitrogen content (RE), and shoot nitrogen accumulation (SNA) in lima bean grown in soil pots with liming (WL) and without liming (WoL), in the presence of different strains of nitrogen-fixing bacteria<sup>1</sup>

Factors	SDM	RDM	TDM	RE <sup>2</sup>	SNA
Treatments	-----g plant <sup>-1</sup> -----			%	mg plant <sup>-1</sup>
UFLA02-195	27.78 B	10.83 C	38.29 B	65.32 B	875.75 A
UFLA02-199	25.81 B	12.73 C	37.00 B	61.05 B	839.71 A
UFLA02-206	28.71 B	8.29 C	38.54 B	67.27 B	888.12 A
UFLA02-207	19.43 C	12.30 C	33.76 B	44.04 C	418.63 B
UFLA02-221	28.17 B	10.30 C	38.47 B	67.56 B	943.75 A
UFLA02-222	27.24 B	14.32 C	39.54 B	64.26 B	1062.32 A
UFLA02-242	19.73 C	9.82 C	28.02 B	46.13 C	626.88 B
UFLA02-244	30.01 B	11.18 C	42.74 B	73.77 B	875.41 A
UFLA02-245	24.76 B	10.51 C	35.60 B	59.24 C	720.41 A
INPA54B	25.23 B	9.44 C	34.68 B	63.75 B	786.22 A
WN <sup>3</sup>	44.49 A	16.01 B	66.12 A	100.0 A	965.70 A
WoN <sup>3</sup>	22.24 C	21.62 A	38.25 B	52.65 C	436.92 B
<b>Soil correction</b>					
WL	39.80 A	12.21 A	42.01 A	68.82 A	901.29 A
WoL	24.13 B	12.36 A	36.49 B	58.68 B	672.02 B

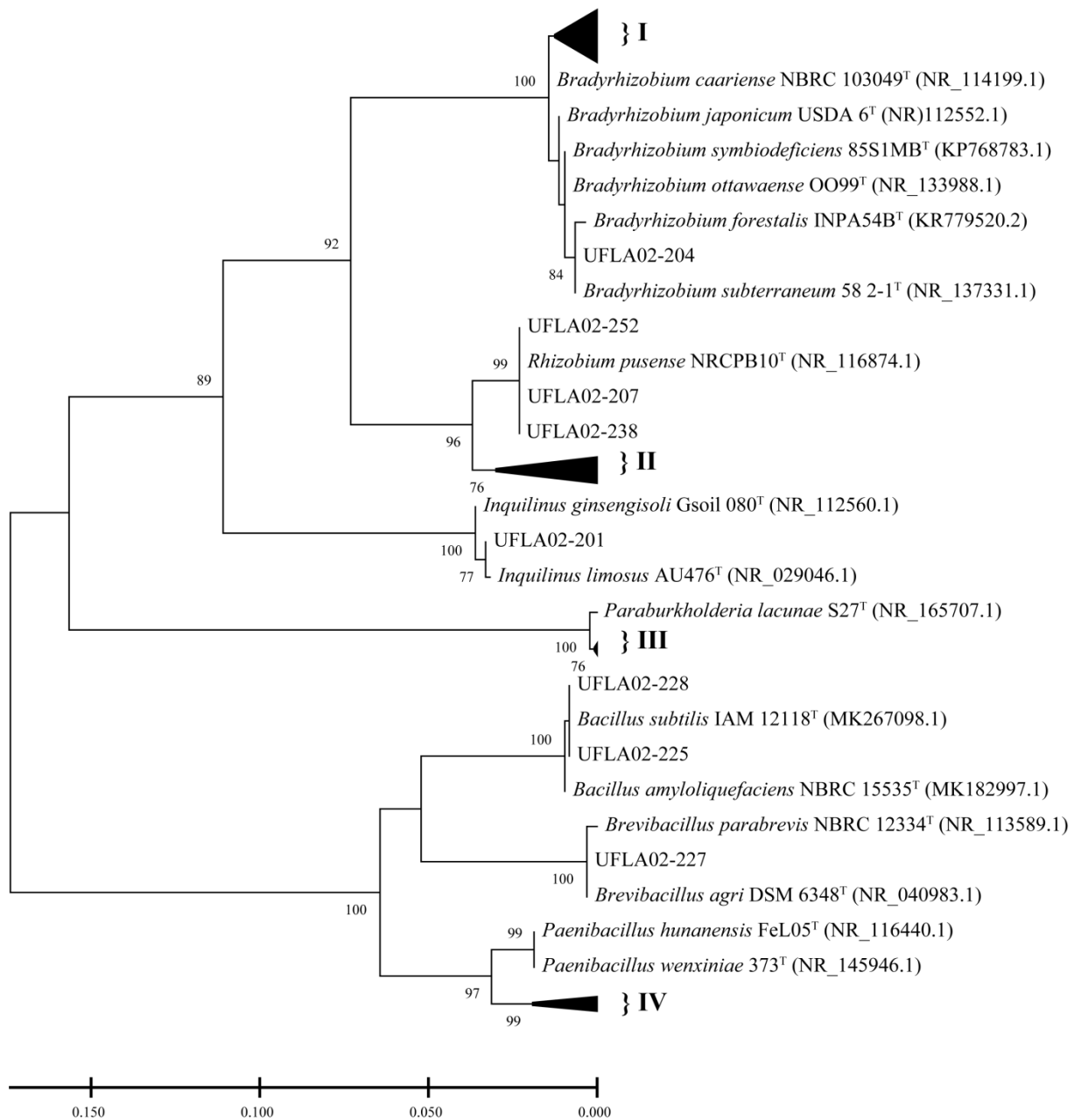
<sup>1</sup> Within the same factor, means followed by the same letters in the column belong to the same group by the Skott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ). <sup>2</sup> Means compared from data transformed into  $\log X_{10}$ . <sup>3</sup> WN and WoN: controls with fertilization of  $300 \text{ mg dm}^{-3}$  of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and without nitrogen fertilization, respectively

**Table 4** Mean values of number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), SPAD index, and total shoot nitrogen content (SNC) in lima bean grown in soil pots with liming (WL) and without liming (WoL) in the presence of different strains of nitrogen-fixing bacteria<sup>1</sup>

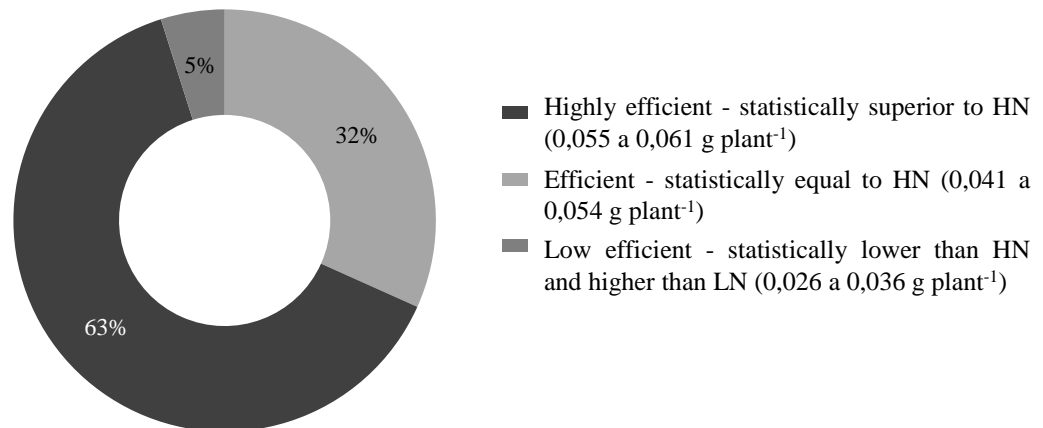
Treatments	NN <sup>2</sup> -		NDM <sup>2</sup> g plant <sup>-1</sup>		SPAD -		SNC %	
	Soil correction							
	WL	WoL	WL	WoL	WL	WoL	WL	WoL
UFLA02-195	926.75 Aa	485.75 Bb	1.50 Aa	1.36 Ca	33.90 Aa	24.82 Ab	3.38 Aa	2.71 Ba
UFLA02-199	861.00 Aa	737.75 Ba	1.55 Aa	1.47 Ba	31.65 Aa	29.55 Aa	3.07 Aa	3.43 Aa
UFLA02-206	1202.75 Aa	1041.33 Aa	1.69 Aa	1.46 Ba	33.02 Aa	27.66 Aa	3.15 Aa	3.12 Ba
UFLA02-207	506.25 Ba	6.66 Cb	1.57 Aa	1.14 Cb	34.00 Aa	17.23 Bb	2.73 Ba	1.32 Cb
UFLA02-221	1157.50 Aa	783.00 Ba	1.62 Aa	1.49 Ba	33.82 Aa	28.40 Aa	3.25 Aa	3.51 Aa
UFLA02-222	1158.50 Aa	1077.50 Aa	1.54 Aa	1.67 Ba	30.80 Aa	28.97 Aa	3.72 Aa	4.11 Aa
UFLA02-242	894.50 Aa	1366.00 Aa	1.51 Aa	1.63 Ba	32.25 Aa	32.75 Aa	2.73 Bb	3.72 Aa
UFLA02-244	676.50 Aa	563.75 Ba	1.74 Aa	1.70 Ba	31.92 Aa	32.77 Aa	3.02 Aa	2.86 Ba
UFLA02-245	1236.75 Aa	1122.25Aa	1.61 Aa	1.60 Ba	34.05 Aa	25.12 Ab	2.86 Ba	3.04 Ba
INPA54B	977.5 Aa	635.50 Ba	1.70 Aa	1.95 Aa	38.75 Aa	28.20 Ab	3.33 Aa	2.96 Ba
WN <sup>3</sup>	86.75 Ca	4.25 Ca	1.19 Ba	1.00 Ca	29.75 Aa	19.92 Bb	2.70 Ba	1.61 Cb
WoN <sup>3</sup>	450.00 Ba	25.00 Cb	1.65 Aa	1.15 Cb	30.20 Aa	20.92 Bb	2.50 Ba	1.25 Cb
Average	844.56 a	654.06 b	1.54 a	1.26 b	32.84 a	26.36 b	3.04 a	2.80 b

<sup>1</sup> Mean values followed by the same uppercase letter in the columns and lowercase letter in the rows belong to the same group by the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ); <sup>2</sup> Mean values compared from the data transformed in  $\sqrt{(x + 1)}$ ; <sup>3</sup> WN and WoN: controls with fertilization of 300 mg dm<sup>-3</sup> of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and without nitrogen fertilization, respectively

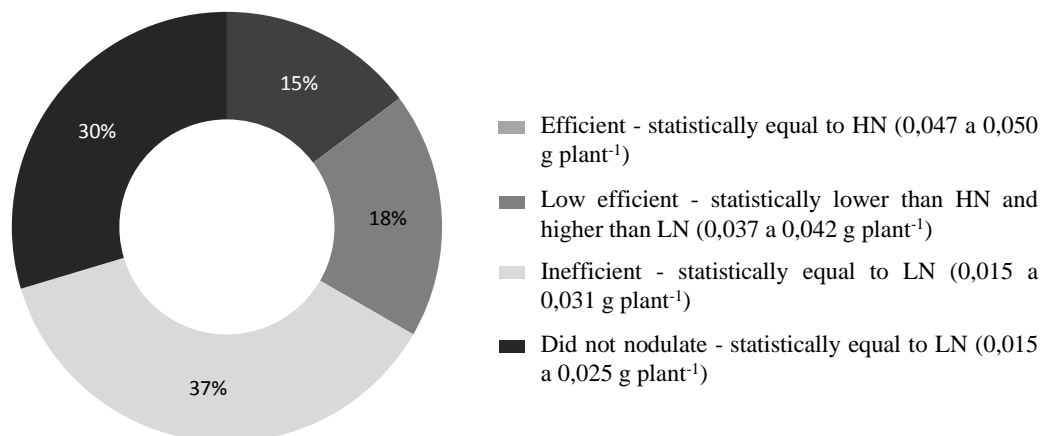
## LIST OF FIGURES



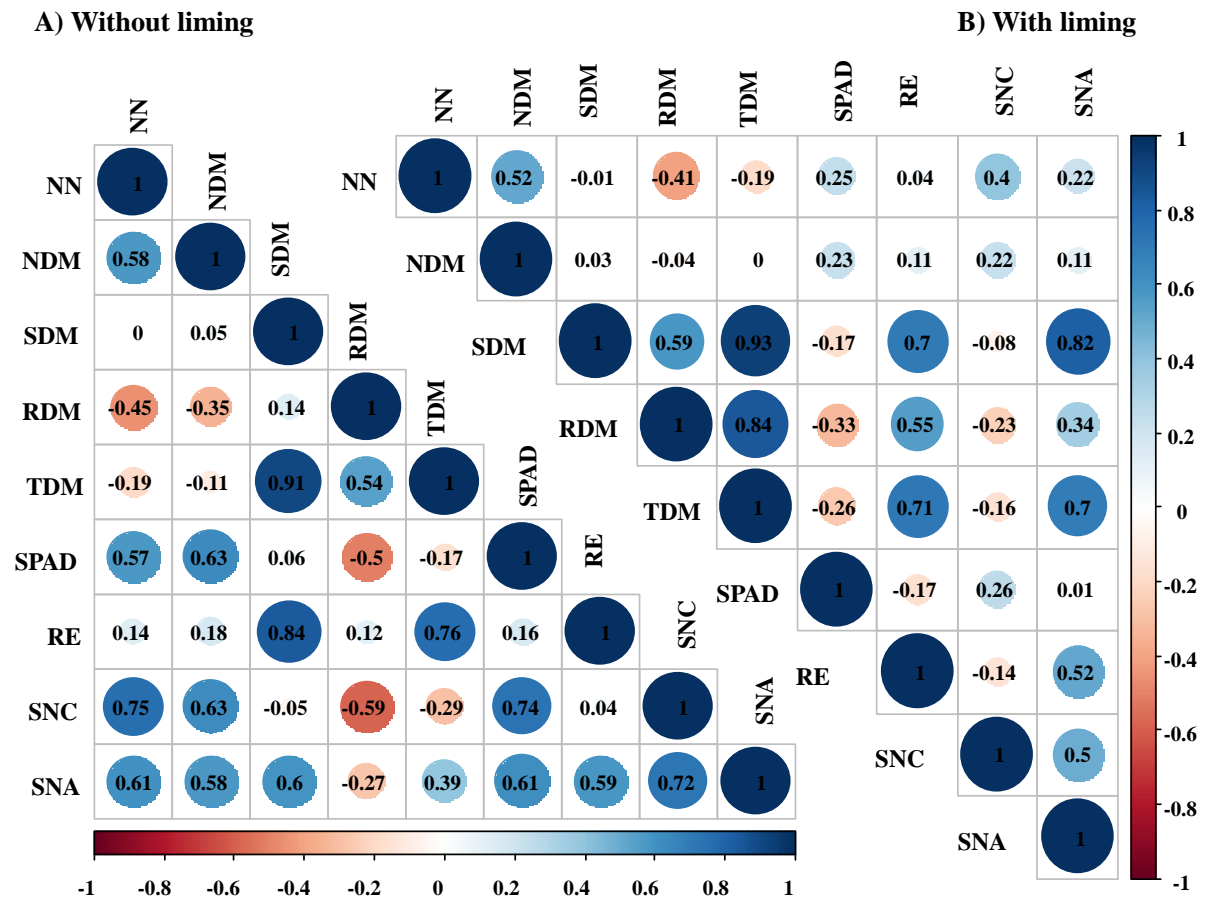
**Fig. 1** Phylogenetic tree of maximum likelihood based on sequences of the 16S rRNA gene of type strains and strains isolated from nodules of *Phaseolus lunatus* L. The bootstrap values were based on 1000 replicates. All the positions containing gaps and absent data were eliminated from the dataset. The bootstrap values > 70% are indicated in the nodes. Phylogenetic analyses were conducted in Mega5. Identification was based on partial sequences with 650 base pairs of the 16S rRNA gene. The list of strains in groups I to IV are shown in Table 2



**Fig. 2** Percentage of strains of axenic Trial 1 by class of efficiency for SNA (shoot nitrogen accumulation) in relation to the treatments that received high (WN) and low (WoN) content of mineral N, with results for this variable of 0.049 g plant<sup>-1</sup> and 0.012 g plant<sup>-1</sup>, respectively. There was a statistical difference between the classes by the Scott-Knott test at 5% probability



**Fig. 3** Percentage of strains of axenic Trial 2 by class of efficiency for SNA (shoot nitrogen accumulation) in relation to the treatments that received high (WN) and low (WoN) content of mineral N, with results for this variable of 0.049 g plant<sup>-1</sup> and 0.015 g plant<sup>-1</sup>, respectively. There was a statistical difference between the classes by the Scott-Knott test at 5% probability



**Fig. 4** Pearson correlation for the experiment in non-axenic conditions, in a pot with soil without (A) and with liming (B)



**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**Table S1** Table of mean values of number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM), efficiency relative to the treatment that received high mineral nitrogen content (RE), SPAD index (SPAD), total shoot nitrogen content (SNC), and shoot nitrogen accumulation (SNA) obtained in Trial 1 of symbiotic efficiency in lima bean plants under axenic conditions under the different sources of nitrogen at 50 days after sowing<sup>1</sup>

Sources of N	NN <sup>2</sup>	NDM <sup>2</sup>	SDM	RDM <sup>2</sup>	TDM	RE <sup>2</sup>	SPAD	SNC	SNA
	-		----- g plant <sup>-1</sup> -----			%	-	%	g plant <sup>-1</sup>
UFLA02-199	225.67 b	0.06 c	1.61 b	0.43 c	2.05 b	80.32 b	40.20 a	3.77 a	0.061 a
UFLA02-200	227.33 b	0.05 c	1.37 c	0.34 c	1.71 c	68.29 c	32.10 b	3.70 a	0.051 b
UFLA02-202	508.67 a	0.10 a	1.41 c	0.40 c	1.81 c	70.58 c	39.50 a	4.60 a	0.064 a
UFLA02-205	248.67 b	0.07 b	1.61 b	0.36 c	1.98 c	80.46 b	41.30 a	3.70 a	0.060 a
UFLA02-206	363.00 a	0.08 b	1.70 b	0.45 c	2.15 b	84.66 b	42.43 a	3.53 a	0.060 a
UFLA02-208	297.00 b	0.08 b	1.29 c	0.39 c	1.68 c	64.08 c	36.60 b	3.85 a	0.050 b
UFLA02-209	477.00 a	0.09 b	1.40 c	0.40 c	1.80 c	69.53 c	40.07 a	3.83 a	0.054 b
UFLA02-210	362.67 a	0.08 b	1.36 c	0.35 c	1.71 c	67.72 c	39.23 a	3.60 a	0.048 b
UFLA02-211	505.00 a	0.11 a	1.47 c	0.40 c	1.87 c	73.01 c	41.10 a	3.80 a	0.055 a
UFLA02-213	374.00 a	0.05 c	1.07 c	0.47 c	1.54 c	53.26 c	19.20 c	2.47 b	0.026 c
UFLA02-214	455.00 a	0.06 c	1.44 c	0.39 c	1.84 c	72.05 c	39.95 a	3.60 a	0.052 b
UFLA02-215	370.67 a	0.07 b	1.47 c	0.40 c	1.87 c	73.53 c	38.13 a	3.47 a	0.050 b
UFLA02-217	269.00 b	0.06 c	1.57 b	0.35 c	1.92 c	78.48 b	38.13 a	3.63 a	0.057 a
UFLA02-218	451.33 a	0.09 b	1.45 c	0.35 c	1.81 c	72.61 c	37.27 a	3.77 a	0.054 b
UFLA02-220	381.67 a	0.09 b	1.43 c	0.34 c	1.78 c	71.30 c	37.73 a	3.80 a	0.054 b
UFLA02-222	397.00 a	0.08 b	1.74 b	0.41 c	2.15 b	86.61 a	41.20 a	3.90 a	0.068 a
UFLA02-230	557.33 a	0.12 a	1.47 c	0.38 c	1.85 c	73.52 c	38.73 a	3.57 a	0.053 b
UFLA02-231	407.00 a	0.14 a	1.52 c	0.43 c	1.95 c	75.74 b	38.33 a	2.70 b	0.041 b
UFLA02-233	254.33 b	0.06 c	1.52 c	0.33 c	1.85 c	76.02 b	38.40 a	4.07 a	0.062 a

UFLA02-235	237.67 b	0.07 b	1.40 c	0.42 c	1.82 c	69.79 c	38.90 a	3.17 a	0.044 b
UFLA02-236	119.33 c	0.05 c	1.35 c	0.52 b	1.87 c	67.65 c	38.23 a	3.27 a	0.044 b
UFLA02-240	261.67 b	0.06 c	1.67 b	0.37 c	2.04 b	83.17 b	35.30 b	3.13 a	0.052 b
UFLA02-241	142.33 c	0.06 c	1.52 c	0.43 c	1.95 c	75.57 b	42.27 a	3.37 a	0.051 b
UFLA02-242	285.67 b	0.07 c	1.81 a	0.40 c	2.21 b	89.99 a	42.30 a	3.07 a	0.055 a
UFLA02-244	215.00 b	0.07 b	1.92 a	0.43 c	2.35 b	95.42 a	42.33 a	3.77 a	0.072 a
UFLA02-245	334.00 b	0.07 b	1.58 b	0.41 c	1.99 c	79.06 b	39.93 a	3.20 a	0.051 b
UFLA02-246	324.00 b	0.06 c	1.58 b	0.50 b	2.08 b	78.97 b	36.75 b	3.30 a	0.052 b
UFLA02-253	208.33 b	0.08 b	1.42 c	0.45 c	1.87 c	70.62 c	37.23 a	3.80 a	0.053 b
UFLA02-254	406.00 a	0.07 b	1.38 c	0.45 c	1.83 c	68.81 c	41.13 a	3.40 a	0.047 b
UFLA02-255	255.00 b	0.06 c	1.44 c	0.50 b	1.94 c	71.41 c	37.30 a	3.57 a	0.051 b
UFLA02-256	282.67 b	0.08 b	1.31 c	0.50 b	1.82 c	65.37 c	33.07 b	3.33 a	0.044 b
UFLA02-257	136.33 c	0.06 c	1.46 c	0.45 c	1.92 c	73.16 c	41.50 a	3.27 a	0.048 b
UFLA02-258	196.33 b	0.05 c	1.30 c	0.39 c	1.69 c	64.60 c	32.23 b	3.60 a	0.047 b
UFLA02-259	91.67 c	0.05 c	1.07 c	0.53 b	1.60 c	53.57 c	34.53 b	3.30 a	0.036 c
UFLA02-260	150.67 c	0.06 c	1.68 b	0.44 c	2.12 b	83.79 b	35.10 b	3.37 a	0.056 a
UFLA02-261	287.33 b	0.07 c	1.33 c	0.36 c	1.69 c	66.16 c	38.57 a	4.30 a	0.057 a
UFLA02-262	130.00 c	0.05 c	1.55 b	0.46 c	2.00 c	77.01 b	38.80 a	3.90 a	0.060 a
UFLA02-263	85.67 c	0.04 c	1.33 c	0.46 c	1.78 c	65.98 c	34.43 b	3.43 a	0.046 b
UFLA02-264	173.33 c	0.07 b	1.32 c	0.39 c	1.71 c	65.80 c	40.83 a	3.43 a	0.045 b
UFLA02-265	125.33 c	0.07 b	1.34 c	0.40 c	1.74 c	66.79 c	39.97 a	3.80 a	0.051 b
INPA54B	166.00 c	0.08 b	1.40 c	0.45 c	1.85 c	69.78 c	37.93 a	2.97 a	0.042 b
HN <sup>(3)</sup>	0.00 d	0.00 d	2.01 a	0.80 a	2.80 a	100.00 a	31.47 b	2.43 b	0.049 b
LN <sup>(3)</sup>	0.00 d	0.00 d	1.23 c	0.53 b	1.77 c	61.08 c	18.13 c	1.00 c	0.012 d
Coefficient of variation (%)	14.09	0.83	11.02	2.59	10.33	5.56	8.79	12.43	12.73

<sup>1</sup> Means followed by equal letters in the columns do not differ, by the Scott-Knott test, at 5% probability. <sup>2</sup> Means compared from transformed data  $(x + 1)^{0.5}$ ;

<sup>3</sup> HN and LN: controls with a concentration of mineral N equal to 52.25 mg L<sup>-1</sup> and 5.25 mg L<sup>-1</sup>, respectively

**Table S2** Table of mean values of number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM), efficiency relative to the treatment that received high mineral nitrogen content (RE), SPAD index (SPAD), total shoot nitrogen content (SNC), and shoot nitrogen accumulation (SNA) obtained in Trial 2 of symbiotic efficiency in lima bean plants under axenic conditions under the different sources of nitrogen at 50 days after sowing<sup>1</sup>

Sources of N	NN <sup>2</sup>	NDM <sup>2</sup>	SDM	RDM <sup>2</sup>	TDM	ER <sup>2</sup>	SPAD <sup>2</sup>	SNC	SNA
	-		----- g plant <sup>-1</sup> -----			%	-	%	g plant <sup>-1</sup>
UFLA02-195	153.33 a	0.03 a	1.52 a	0.55 b	2.07 b	86.74 a	36.27 a	2.37 b	0.036 b
UFLA02-197	0.00 e	0.00 c	1.21 b	0.51 b	1.72 c	69.10 b	12.67 d	1.53 c	0.018 c
UFLA02-198	0.00 e	0.00 c	1.32 a	0.51 b	1.83 c	76.92 a	14.90 d	1.63 c	0.022 c
UFLA02-201	63.67 c	0.03 a	1.36 a	0.58 b	1.94 c	79.02 a	24.63 b	2.13 c	0.028 c
UFLA02-203	58.00 c	0.04 a	1.53 a	0.88 a	2.41 a	88.44 a	36.73 a	2.73 b	0.042 b
UFLA02-204	100.00 b	0.04 a	0.99 b	0.73 b	1.71 c	57.54 b	34.90 a	2.35 b	0.024 c
UFLA02-207	6.00 e	0.01 c	1.25 b	0.85 a	2.10 b	72.11 b	16.33 c	1.47 c	0.018 c
UFLA02-212	59.33 c	0.05 a	1.10 b	0.69 b	1.79 c	63.16 b	27.95 b	2.10 c	0.023 c
UFLA02-216	115.00 b	0.03 a	1.43 a	0.70 b	2.12 b	82.29 a	36.83 a	3.47 a	0.050 a
UFLA02-219	103.33 b	0.03 a	1.40 a	0.61 b	2.01 b	79.89 a	33.67 a	3.47 a	0.048 a
UFLA02-221	200.00 a	0.05 a	1.61 a	0.63 b	2.24 b	92.63 a	34.37 a	3.03 a	0.049 a
UFLA02-223	0.00 e	0.00 c	1.04 b	0.60 b	1.64 c	60.88 b	12.67 d	1.77 c	0.018 c
UFLA02-224	134.67 a	0.04 a	1.24 b	0.81 a	2.05 b	71.46 b	35.97 a	3.07 a	0.038 b
UFLA02-225	0.00 e	0.00 c	1.31 a	0.62 b	1.93 c	75.76 a	14.50 d	1.23 c	0.016 c
UFLA02-227	177.33 a	0.03 a	1.37 a	0.64 b	2.01 b	78.85 a	31.80 b	2.93 a	0.040 b
UFLA02-228	85.67 b	0.03 a	1.43 a	0.58 b	2.01 b	83.06 a	35.77 a	3.27 a	0.047 a
UFLA02-232	36.67 d	0.02 b	1.43 a	0.79 a	2.22 b	81.64 a	13.77 d	1.57 c	0.023 c
UFLA02-237	0.00 e	0.00 c	1.04 b	0.82 a	1.86 c	60.46 b	15.23 d	1.77 c	0.018 c
UFLA02-238	93.33 b	0.04 a	1.19 b	0.89 a	2.08 b	68.77 b	37.13 a	2.53 b	0.031 c
UFLA02-239	0.00 e	0.00 c	1.35 a	0.66 b	2.01 b	78.14 a	13.50 d	1.83 c	0.025 c
UFLA02-243	13.00 d	0.01 c	1.05 b	0.62 b	1.67 c	59.84 b	13.80 d	1.53 c	0.016 c
UFLA02-247	0.00 e	0.00 c	1.18 b	0.59 b	1.77 c	69.65 b	17.53 c	1.30 c	0.015 c

UFLA02-249	3.67 e	0.02 b	1.19 b	0.72 b	1.91 c	69.34 b	19.13 c	1.37 c	0.016 c
UFLA02-250	37.00 d	0.03 a	1.18 b	0.57 b	1.76 c	69.13 b	19.87 c	1.90 c	0.023 c
UFLA02-252	0.00 e	0.00 c	1.16 b	0.72 b	1.88 c	67.88 b	14.00 d	1.40 c	0.016 c
UFLA02-266	219.00 a	0.04 a	1.28 b	0.66 b	1.94 c	73.67 b	31.30 b	2.90 a	0.037 b
INPA54B	174.67 a	0.04 a	1.04 b	0.61 b	1.65 c	60.55 b	32.27 b	2.47 b	0.026 c
HN <sup>(3)</sup>	0.00 e	0.00 c	1.75 a	1.04 a	2.79 a	100.00 a	29.00 b	2.80 b	0.049 a
LN <sup>(3)</sup>	0.00 e	0.00 c	1.15 b	0.61 b	1.75 c	66.28 b	14.60 d	1.33 c	0.015 c
Coefficient of variation (%)	22.07	0.41	12.51	3.70	12.50	9.05	6.38	20.23	25.12

<sup>1</sup> Means followed by equal letters in the columns do not differ, by the Scott-Knott test, at 5% probability. <sup>2</sup> Means compared from transformed data  $(x + 1)^{0.5}$ ;

<sup>3</sup> HN and LN: controls with a concentration of mineral N equal to 52.25 mg L<sup>-1</sup> and 5.25 mg L<sup>-1</sup>, respectively

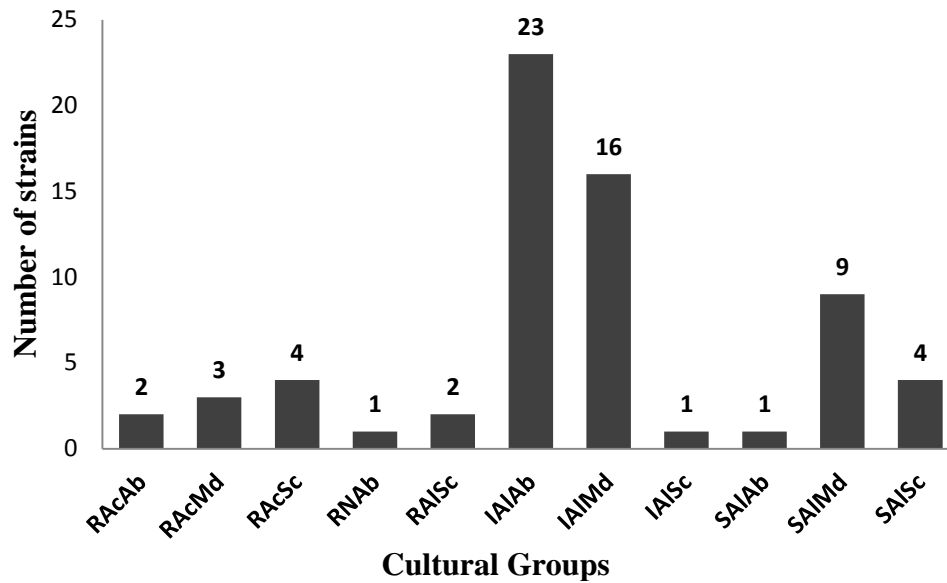
**Table S3** Summary of analysis of variance of the data on number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM), SPAD index, efficiency in relation to the control that received mineral nitrogen (RE), shoot nitrogen content (SNC), and shoot nitrogen accumulation (SNA) obtained in lima bean plants grown in a Humic Rhodic Hapludox for 73 days

Sources of variation	Medium square								
	NN <sup>1</sup>	NDM <sup>1</sup>	SDM	RDM	TDM	SPAD	RE <sup>2</sup>	SNC	SNA
Sources of N (SN)	762.791**	0.280**	336.232**	106.172**	678.395**	65.327**	0.079**	2.906**	0.326**
Soil correction (SC)	824.589**	0.248*	772.310**	0.522	733.001**	1008.158**	0.126**	1.309*	1.260**
SN x SC	94.342*	0.094*	32.765	25.111	52.455	54.506**	0.017	1.102**	0.079
Block	37.931	0.022	28.897	53.036**	157.188	2.960	0.191**	0.131	0.051
Error	47.762	0.041	40.867	12.909	61.093	16.362	0.017	0.211	0.045
Coefficient of variation (%)	28.03	13.4	23.7	29.25	19.91	13.66	7.46	15.77	27.02
Average	749	1.4	26.97	12.28	39.25	29.6	63.76	2.92	787

Means compared from data transformed into: <sup>1</sup> $\sqrt{(x + 1)}$  and <sup>2</sup> $\log X_{10}$ ; \*\* and \*: Significant at the levels of 1% and 5% probability, respectively, by the F test

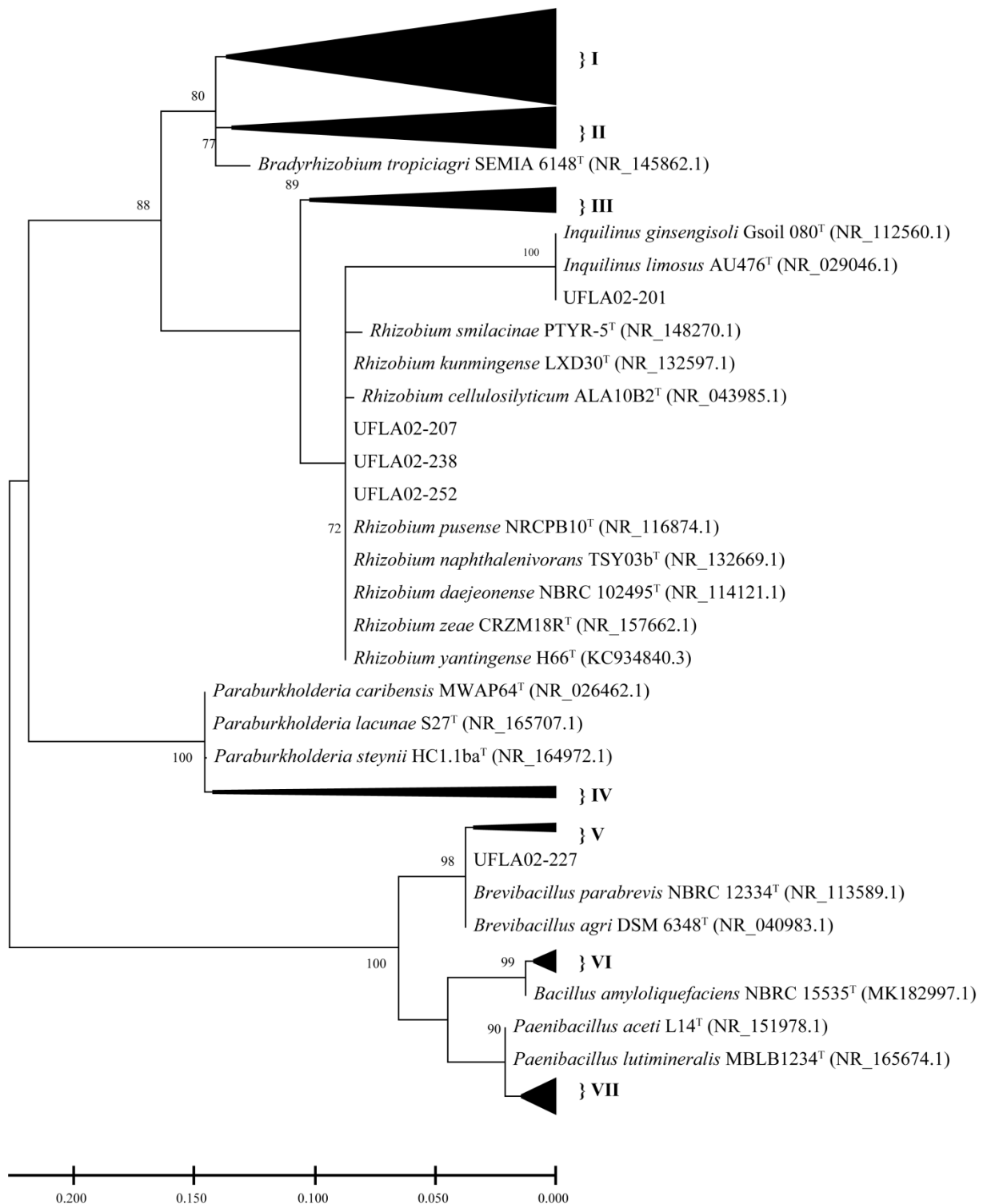
**Table S4** Type strains and stains isolated from nodules of *Phaseolus lunatus* L. in the compact groups of the phylogenetic tree presented in Fig. S2, constructed as based on the 16S rRNA gene sequences

Group	Strain
I	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76 <sup>T</sup> (NR_117947.1), <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> PAC48 <sup>T</sup> (NR_043037.1), <i>Bradyrhizobium ferriligni</i> CCBAU 51502 <sup>T</sup> (KX683400.1), <i>Bradyrhizobium namibiense</i> 5-10 <sup>T</sup> (NR_159233.1), <i>Bradyrhizobium canariense</i> NBRCT 103049 <sup>T</sup> (NR_114199.1), <i>Bradyrhizobium uaiense</i> UFLA 03-164 <sup>T</sup> (KC879705.2), UFLA02-222, UFLA02-220, UFLA02-218, UFLA02-214, UFLA02-211, UFLA02-210, UFLA02-209, UFLA02-206, UFLA02-205, UFLA02-202, UFLA02-200, UFLA02-265, UFLA02-262, UFLA02-258, UFLA02-257, UFLA02-255, UFLA02-254, UFLA02-253, UFLA02-246, UFLA02-245, UFLA02-242, UFLA02-240, UFLA02-233, UFLA02-231, UFLA02-221, UFLA 02-217, UFLA02-215, UFLA 02-199, <i>Bradyrhizobium icense</i> LMTR 13 <sup>T</sup> (NR_133707.1)
II	<i>Bradyrhizobium guangdongense</i> CCBAU 51649 <sup>T</sup> (NR_145893.1), <i>Bradyrhizobium rifense</i> CTAW71 <sup>T</sup> (EU561074.2), UFLA02-256, <i>Bradyrhizobium forestalis</i> INPA54B <sup>T</sup> (KR779520.2), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6 <sup>T</sup> (NR_112552.1), UFLA02-208, UFLA02-235, UFLA02-244, UFLA02-260, UFLA02-261, UFLA02-204, <i>Bradyrhizobium subterraneum</i> 58 2-1 <sup>T</sup> (NR_137331.1), <i>Bradyrhizobium neotropicale</i> BR 10247 <sup>T</sup> (NR_133987.1), <i>Bradyrhizobium symbiodeficiens</i> 85S1MB <sup>T</sup> (KP768783.1), <i>Bradyrhizobium ottawaense</i> OO99 <sup>T</sup> (NR_133988.1)
III	<i>Rhizobium gallicum</i> R602sp <sup>T</sup> (NR_036785.1), <i>Rhizobium loessense</i> CCBAU 7190B <sup>T</sup> (NR_028819.1), <i>Rhizobium viscosum</i> LMG 16473 <sup>T</sup> (NR_042253.1), <i>Rhizobium yanglingense</i> SH22623 <sup>T</sup> (NR_028663.1), <i>Rhizobium alamii</i> GBV016 <sup>T</sup> (NR_042687.1), <i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 <sup>T</sup> (NR_043548.1), UFLA02-232, UFLA02-198, <i>Rhizobium sullae</i> IS 123 <sup>T</sup> (NR_029330.1)
IV	UFLA02-197, <i>Paraburkholderia sabiae</i> Br3407 <sup>T</sup> (NR_043180.1), <i>Paraburkholderia phymatum</i> STM815 <sup>T</sup> (NR_027555.1), <i>Paraburkholderia azotifigens</i> NF2-5-3 <sup>T</sup> (NR_159311.1)
V	<i>Brevibacillus centrosporus</i> DSM 8445 <sup>T</sup> (NR_112211.1), <i>Brevibacillus nitrificans</i> DA2 <sup>T</sup> (NR_12926.1), <i>Brevibacillus choshinensis</i> NBRC 15518 <sup>T</sup> (NR_113763.1)
VI	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 <sup>T</sup> (NR_024696.1), <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 ATCC 6051 <sup>T</sup> (MN640967.1), <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-41580 <sup>T</sup> (KY694464.1), <i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 <sup>T</sup> (MN543830.1), <i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 <sup>T</sup> (MK267098.1), UFLA02-228, UFLA02-225, <i>Bacillus mojavensis</i> ifo 15718 <sup>T</sup> (NR_118290.1)
VII	<i>Paenibacillus hunanensis</i> FeL05 <sup>T</sup> (NR_116440.1), <i>Paenibacillus wenxiniae</i> 373 <sup>T</sup> (NR_145946.1), <i>Paenibacillus medicaginis</i> CC-Alfalfa-19 <sup>T</sup> (NR_145626.1), <i>Paenibacillus terreus</i> D33 <sup>T</sup> (NR_147741.1), UFLA02-243, UFLA02-239, UFLA02-247, UFLA02-250, <i>Paenibacillus borealis</i> KK19 <sup>T</sup> (NR_025299.1), <i>Paenibacillus relictisesami</i> KB0549 <sup>T</sup> (NR_133806.1), <i>Paenibacillus albilobatus</i> h2 <sup>T</sup> (NR_169354.1), <i>Paenibacillus cellulositrophicus</i> P2-1 <sup>T</sup> (NR_116564.1), <i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 <sup>T</sup> (NR_042189.1)



**Fig. S1** Distribution of the isolates from lima bean by culture groups

**RAcAb:** Rapid growth, acidification of the medium, and abundant gum production; **RAcMd:** Rapid growth, acidification of the medium, and moderate gum production; **RAcSc:** Rapid growth, acidification of the medium, and scarce gum production; **RNAb:** Rapid growth, no alteration in pH of the medium (neutral), and abundant gum production; **RAISc:** Rapid growth, alkalization of the medium, and scarce gum production; **IAIAb:** Intermediate growth, alkalization of the medium, and abundant gum production; **IAIMd:** Intermediate growth, alkalization of the medium, and moderate gum production; **IAISc:** Intermediate growth, alkalization of the medium, and scarce gum production; **SAIAb:** Slow growth, alkalization of the medium, and abundant gum production; **SAIMd:** Slow growth, alkalization of the medium, and moderate gum production; **SAISc:** Slow growth, alkalization of the medium, and scarce gum production



**Fig. S2** Phylogenetic tree of maximum likelihood based on sequences of the 16S rRNA gene of type strains and strains isolated from nodules of *Phaseolus lunatus* L. The bootstrap values were based on 1000 replicates. All the positions containing gaps and absent data were eliminated from the dataset. The bootstrap values > 70% are indicated in the nodes. Phylogenetic analyses were conducted in Mega5. Identification was based on partial sequences with 300 base pairs of the 16S rRNA gene. The list of strains in groups I to VII are shown in Table S4