



Phenotypic diversity of bacteria in root nodules of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae)

Diversidade fenotípica de bactérias em nódulos de raízes de Dalbergia ecastaphyllum (L.) Taub. (Fabaceae)

Lidia Del Carmen Trujillo Pacheco¹, Jônatas Oliveira Costa², Flávia de Barros Prado Moura³, José Jailson Lima Bezerra^{4*}, Ana Paula do Nascimento Prata⁵

Abstract: Many species belonging to family Fabaceae are able to establish symbiotic relationships with nitrogen-fixing bacteria. Studies developed with *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., for example, have demonstrated the symbiotic potential of this species. In this sense, this study aimed to analyze the phenotypic characteristics of rhizobia isolated from *D. ecastaphyllum* and to identify whether these bacterial isolates are capable of establishing symbiotic relationships with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *D. ecastaphyllum* seeds were sown in soil samples collected in Japaratinga, Alagoas, Brazil, in three zones located at different distances from the high tide line. At 60 days after the emergence of the plants, nodulation in the roots of *D. ecastaphyllum* was analyzed and the bacteria were isolated. Subsequently, the phenotypic characterization of the bacteria was carried out based on some criteria (growth time, type of pH, colony color, type of mucus and amount of mucus). For the nodulation test, the species *V. unguiculata* was used. In total, 17 phenotypic types of bacterial isolates were identified, of which 8 are fast-growing and 9 are intermediate-growth. Regarding the type of pH, 7 phenotypes are acidic pH, 8 are neutral pH and 2 are alkaline pH. As for the coloring of the bacterial colonies, 5 are yellow, 7 white and 5 pink. It was also observed the presence of consistent and aqueous mucus in colonies from the three different areas. Only 7 bacterial phenotypic types and the commercial inoculant were efficient in the nodulation of *V. unguiculata*.

Key words: Legumes. Symbiotic relationship. Rhizobia.

Resumo: Muitas espécies pertencentes a família Fabaceae são capazes de estabelecer relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio. Estudos desenvolvidos com *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., por exemplo, têm demonstrado o potencial simbiótico desta espécie. Neste sentido, objetivou-se analisar as características fenotípicas de rizóbios isolados de *D. ecastaphyllum* e identificar se estes isolados bacterianos são capazes de estabelecer relações simbióticas com *Vigna unguiculata* (L.) Walp. As sementes de *D. ecastaphyllum* foram semeadas em amostras de solos coletadas em Japaratinga, Alagoas, Brasil, em três zonas situadas a diferentes distâncias da linha de maré alta. Aos 60 dias após a emergência das plantas, foi analisada a nodulação nas raízes de *D. ecastaphyllum* e realizado o isolamento das bactérias. Posteriormente, foi realizada a caracterização fenotípica das bactérias com base em alguns critérios (tempo de crescimento, pH, coloração das colônias, muco e quantidade de muco). Para o teste de nodulação, foi utilizada a espécie *V. unguiculata*. No total, foram identificados 17 tipos fenotípicos dos isolados bacterianos, dos quais oito são de crescimento rápido e nove de crescimento intermediário. Em relação ao pH, sete fenótipos são de pH ácido, oito de pH neutro e duas de pH alcalino. Quanto a coloração das colônias bacterianas, cinco são de coloração amarela, sete de coloração branca e cinco de coloração rosa. Foi observada ainda a presença de muco consistente e aquoso em colônias das três áreas diferentes. Apenas sete tipos fenotípicos bacterianos e o inoculante comercial foram eficientes na nodulação de *V. unguiculata*.

Palavras-chave: Leguminosas. Relação simbiótica. Rizóbios.

*Corresponding author

Submitted for publication on 08/01/2021, approved on 02/04/2021 and published on 20/04/2021

¹Bióloga, Mestre em Agronomia (Produção Vegetal). Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: trujilloluna7@gmail.com

²Acadêmico de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, Brasil. E-mail: taas_costa@hotmail.com

³Docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, Brasil. E-mail: fbpm@mhn.ufal.br

⁴Biólogo, Doutorando em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Botânica, Recife – PE, Brasil. E-mail: josejailson.bezerra@hotmail.com (Autor Correspondente)

⁵Docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: ana.prata@ceca.ufal.br

INTRODUCTION

The Fabaceae family is one of the most diversified among the angiosperms encompassing 19,500 species distributed in about 730 genera and three subfamilies: Caesalpinioideae, Mimosoideae, and Faboideae (LEWIS *et al.*, 2005). In general, this family is characterized by presenting representatives of the most diverse types of habit: trees such as pau-brasil (*Paubrasilia echinata* (Lam.) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis.) and jacarandá-da-Bahia *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth., bushes such as topete-de-cardeal (*Calliandra tweediei* Benth), lianas such as estojode-luneta (*Dioclea violacea* Mart. ex Benth), and even aquatic plants such as *Neptunia pubescens* Benth (SILVEIRA; MIOTTO, 2013).

The genus *Dalbergia* is included in the subfamily Faboideae (Papilionoideae), consisting of small to medium-sized trees, shrubs, vines, and lianas with leathery, alternate, and compound leaves (SAHA *et al.*, 2013). *Dalbergia* belongs to the Dalbergieae clade and has approximately 300 species with very wide distribution in the tropical regions of Central and South America, Africa, Madagascar, and Southern Asia (VATANPARAST *et al.*, 2013). The diversity of bacteria present in root nodules of species of this genus is little known. Nodulation has been recorded and studied in about 50 of these 300 species that have aescynomenoid root nodules (SPRENT *et al.*, 2013).

The species *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. is popularly known as rabo-de-bugio, marmeleiro-da-praia, among several other popular names (BONALDI; RODERJAN, 2017; MORAIS *et al.*, 2019). In Brazil, it is found from the north coast of the country to the municipality of Palhoça in Santa Catarina (CAMARGO, 2005). This species has a shrubby habit and presents characteristics of the liana/ twining/ climbing type (FILARDI *et al.*, 2020).

In general, the symbiotic relationships between soil bacteria, collectively known as rhizobia (which includes the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Sinorhizobium*), and the roots of legumes generate nodules (a new differentiated organ), in which all organisms are benefited (DICENZO *et al.*, 2019; SCHWEMBER *et al.*, 2019). However, this process depends on the compatible interaction between plant and bacteria (GOURION *et al.*, 2015). Nitrogen-fixing microorganisms are extremely important for agriculture and this has encouraged studies on the diversity and description of a large number of rhizobia species (RIBEIRO *et al.*, 2012).

INTRODUÇÃO

A família Fabaceae é uma das mais diversificadas entre as angiospermas, agrupando cerca de 730 gêneros e 19.500 espécies distribuídas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (LEWIS *et al.*, 2005). De forma geral, esta família é caracterizada por apresentar representantes dos mais diversos tipos de hábito: árvores conhecidas como o pau-brasil (*Paubrasilia echinata* (Lam.) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis.) e o jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.), arbustos, como topete-de-cardeal (*Calliandra tweediei* Benth), lianas, como a estojode-luneta (*Dioclea violacea* Mart. ex Benth), e até plantas aquáticas, como *Neptunia pubescens* Benth (SILVEIRA; MIOTTO, 2013).

O gênero *Dalbergia* está incluído na subfamília Faboideae (Papilionoideae), sendo constituído por árvores de pequeno a médio porte, arbustos, trepadeiras e lianas com folhas coriáceas, alternadas e compostas (SAHA *et al.*, 2013). *Dalbergia* conta com aproximadamente 300 espécies e pertence ao clado Dalbergieae, sua distribuição é muito ampla nas regiões tropicais da América Central e do Sul, África, Madagascar e Sul da Ásia (VATANPARAST *et al.*, 2013). Para esse gênero, a diversidade de bactérias presentes nos nódulos radiculares é pouco conhecida. Foi registrada e estudada a nodulação em cerca de 50 dessas 300 espécies que têm nódulos radiculares do tipo esquisinomenóides (SPRENT *et al.*, 2013).

A espécie *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. é popularmente conhecida como rabo-de-bugio, marmeleiro-da-praia, entre vários outros nomes populares (BONALDI; RODERJAN, 2017; MORAIS *et al.*, 2019). No Brasil, *Dalbergia ecastaphyllum* é encontrada desde o litoral Norte até o município de Palhoça, em Santa Catarina (CAMARGO, 2005). Esta espécie possui um porte arbustivo e apresenta características do tipo liana/volúvel/trepadeira (FILARDI *et al.*, 2020).

De forma geral, as relações simbióticas entre as bactérias do solo, coletivamente conhecidas como rizóbios (que inclui os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), e as raízes de leguminosas geram nódulos (um novo órgão diferenciado), em que todos os organismos são beneficiados (DICENZO *et al.*, 2019; SCHWEMBER *et al.*, 2019). No entanto, esse processo depende da interação compatível entre planta e bactérias do solo (GOURION *et al.*, 2015). Microorganismos fixadores de nitrogênio são extremamente importantes para a agricultura e isso tem promovido estudos sobre a diversidade e a descrição de um grande número de espécies de rizóbios (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Works on nodulation in the genus *Dalbergia* report associations with a great diversity of rhizobia. They are of the α -class of Proteobacteria, of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* (RASOLOMAMPINANINA *et al.*, 2005). From the β -class of Proteobacteria, associations with *Burkholderia* (currently *Paraburkholderia*) were recorded in *Dalbergia odorifera* T. (LU *et al.*, 2012) and *Dalbergia inundata* Spruce ex Benth. (MOREIRA *et al.*, 2016).

Other associations of *Burkholderia* and *Ralstonia* have also been reported with *Dalbergia maritima* R.Vig., *Dalbergia madagascariensis* Vatke, *Dalbergia baronii* Baker, *Dalbergia chapielieri* Baill., *Dalbergia purpurascens* Baill., *Dalbergia louvelii* R.Vig., and *Dalbergia monticola* Bosser & R. Rabev. (RASOLOMAMPINANINA *et al.*, 2005). There are reports of an association of *Dalbergia ecastaphyllum* with the genus *Bradyrhizobium*, but the symbiotic efficiency between them has not yet been tested (PARKER; ROSTEAU, 2014).

Thus, the objective of this study was to analyze the diversity and phenotypic characteristics of rhizobia isolated from *D. ecastaphyllum* and to identify bacterial isolates capable of establishing symbiotic relationships with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. The results can be used for restoration of disturbed ecosystems (NOGUEIRA *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2014) since *D. ecastaphyllum* is a species that grows in estuarine and mangrove areas and has been widely used in the recovery of degraded areas (MATA *et al.*, 2014). In this sense, bacterial isolates from plant nodules that grow in degraded and/or saline soils may be a potential resource for use in nitrogen-poor cultivated soils.

MATERIAL AND METHODS

Substrate and *Dalbergia ecastaphyllum* seed sample collection

Dalbergia ecastaphyllum seeds were collected in the village of Bitingui, Japaratinga - AL, under the mother plant or on the beach line. The seeds were put in a glass jar and stored in the laboratory of the Reference Center for Recovery of Degraded Areas in the lower São Francisco (CRAD) of the Federal University of Alagoas (UFAL).

Os trabalhos realizados sobre nodulação do gênero *Dalbergia*, registraram associações com uma grande diversidade de rizóbios. Eles são da classe α -Protobacteria, dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium* *Rhizobium* (RASOLOMAMPINANINA *et al.*, 2005). Da classe β -Protobacteria foram registradas associações com *Burkholderia* (atual *Paraburkholderia*) em *Dalbergia odorifera* T. (LU *et al.*, 2012) e *Dalbergia inundata* Spruce ex Benth. (MOREIRA *et al.*, 2016).

Outras associações de *Burkholderia* e *Ralstonia* também foram relatadas para as espécies *Dalbergia maritima* R.Vig., *Dalbergia madagascariensis* Vatke, *Dalbergia baronii* Baker, *Dalbergia chapielieri* Baill., *Dalbergia purpurascens* Baill., *Dalbergia louvelii* R.Vig. e *Dalbergia monticola* Bosser & R. Rabev. (RASOLOMAMPINANINA *et al.*, 2005). Existem relatos de associação de *Dalbergia ecastaphyllum* com o gênero *Bradyrhizobium*, mas ainda não foi testada a eficiência simbiótica entre eles (PARKER; ROSTEAU, 2014).

Assim, objetivou-se analisar a diversidade e características fenotípicas de rizóbios isolados de *D. ecastaphyllum* e identificar isolados bacterianos capazes de estabelecer relações simbióticas com *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Os resultados poderão ser usados para recuperar áreas degradadas (NOGUEIRA *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2014), uma vez que *D. ecastaphyllum* é uma espécie que cresce em zonas de estuários e manguezais e tem sido bastante utilizada na recuperação de áreas degradadas (MATA *et al.*, 2014). Neste sentido, as bactérias isoladas de nódulos de plantas que crescem em solos degradados e/ou salinos, podem ser um recurso potencial para uso na agricultura em terras com deficiência de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras do substrato e sementes de *Dalbergia ecastaphyllum*

A coleta das sementes de *Dalbergia ecastaphyllum* foi realizada no povoado Bitingui, Japaratinga - AL, sob a planta mãe ou na linha de praia. As sementes foram depositadas em um frasco de vidro e armazenadas no laboratório do Centro de Referência em Recuperação de Áreas Degradadas do baixo São Francisco (CRAD) na Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Substrate was collected in the Costa dos Corais Environmental Protection Area (EPA), municipality of Japaratinga, located on the north coast of the state of Alagoas, Brazil, in September 2018. As collection criterion, the area was divided into three parts based on the highest tide line: Area 1 (A1) (09 06' 45'' 35 16' 03'') at 10 m from the highest tide line; Area 2 (A2) (09 09' 21'' 35 17' 20'') at 30 m; and Area 3 (A3) (09 09' 24'' 35 17' 23'') at 60 m (Figure 1).

A coleta do substrato foi realizada na zona da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais, município de Japaratinga, localizado na costa Norte do estado de Alagoas, Brasil, em setembro de 2018. Como critério de coleta, a área foi dividida em três partes tomando como base a linha marcada pela maré mais alta: Área 1 (A1) (09 06' 45'' 35 16' 03'') a 10 m, Área 2 (A2) (09 09' 21'' 35 17' 20'') a 30 m da linha da maré mais alta e Área 3 (A3) (09 09' 24'' 35 17' 23'') a 60 m (Figura 1).

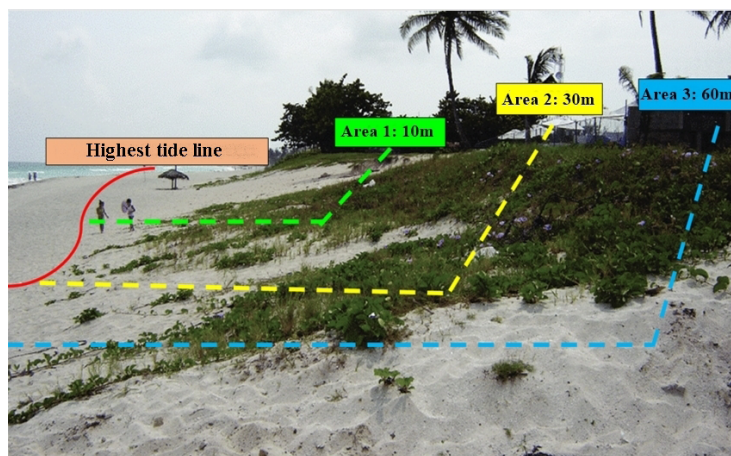


Figure 1 - Division of the sand strip for collection of substrate in the coastal area of Porto de Pedras, Alagoas, Brazil.

Figura 1 - Divisão da faixa de areia para coleta do substrato, na zona costeira de Porto de Pedras, Alagoas, Brasil.

Sowing of *Dalbergia ecastaphyllum*

A portion of 500 g of the substrate collected were placed in 500 mL disposable cups, disinfected with 70% alcohol and identified with labels (Ax: Area, Rx: Replicate number). Substrate samples were subjected to chemical analysis by the LDTA Analytical Center following the methodology of the Brazilian Agricultural Research Agency (EMBRAPA).

Seeds of *D. ecastaphyllum* were superficially disinfected by submersion in 70% alcohol for 1 min and in sodium hypochlorite (2%) for 3 min and then washed six times with autoclaved distilled water and left for three days submerged in distilled and autoclaved water for hydration. Two seeds were sown per cup and germination was observed after a period of four months. This stage of the experiment was conducted in a greenhouse.

Semeadura de *Dalbergia ecastaphyllum*

Foram colocados 500 g do substrato coletado em copos descartáveis de 500 mL, desinfetados com álcool 70% e identificados com etiquetas (Ax: Área, Rx: Número de repetição). Amostras do substrato foram submetidas às análises químicas pela Central Analítica LDTA, com a metodologia da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias).

As sementes de *D. ecastaphyllum* foram desinfestadas superficialmente durante 1 min submersas em álcool a 70% e 3 min em hipoclorito de sódio (2%), sendo lavadas depois seis vezes com água destilada autoclavada e deixadas durante três dias submersas em água destilada e autoclavada para se hidratar. Foram semeadas duas sementes por copo e a germinação foi observada após um período de quatro meses. Essa etapa do experimento foi conduzida em casa de vegetação.

Collection of nodules from *Dalbergia ecastaphyllum* roots

Two months after germination, the plants were taken to the laboratory of the CRAD for collection of root nodules. First, the roots of the samples were washed very carefully so as not to lose nodules. Then each plant was individually washed, one by one, in a metal tray with distilled water. After substrate was completely removed from the roots, the position and morphology of nodules were analyzed. Each nodule was removed with metal tweezers and placed in a tube with blue silica gel (4/8 mm) for one month to eliminate moisture and prevent the presence of fungi.

Isolation of bacteria from *Dalbergia ecastaphyllum* root nodules

A total of 256 nodules were collected from the roots of *Dalbergia ecastaphyllum*. Nodules were individually placed in 1.5 ml microtubes with autoclaved distilled water (1 ml) for a period of 1 h. Subsequently, the nodules were macerated with sterile tweezers to be isolated in Petri dishes with culture medium 79 (FREUD; WAKSMAN, 1928), also called YMA culture medium (VINCENT, 1970), and 400 µL of commercial fungicide Nystatin was added. Four nodules per Petri dish were striated with a platinum handle and placed in a BOD chamber at 28 °C. After bacterial growth, the microorganisms were individually isolated. The Petri dishes were incubated again in a BOD chamber until appearance of colonies. Successive replays were performed until pure colonies were obtained for later phenotypic characterization.

Phenotypic characterization of bacterial isolates

The phenotypic characterization of the isolates was made by observing the bacterial colonies and their growth time (fast: 1 to 3 days; intermediate: 4 to 5 days; slow: 6 days; very slow: > 10 days). The change in pH in the culture medium (acid, neutral, and alkaline), color of the colony, and mucus production were also considered. The data of the phenotypic characteristics were analyzed using a binary matrix (1 - positive and 0 - negative) and the isolates were grouped by the UPGMA method using the Jaccard coefficient. The cluster analysis was performed using the PAST software (HAMMER *et al.*, 2001).

Coleta dos nódulos nas raízes de *Dalbergia ecastaphyllum*

Dois meses após a germinação, as plantas foram levadas para o laboratório do CRAD para que fosse realizada a coleta dos nódulos nas raízes. Primeiro foi feita a lavagem das raízes das amostras com muito cuidado para não perder os nódulos. Em seguida a lavagem foi feita de forma individual, planta por planta, em bandeja de metal com água destilada. Depois de retirado todo o substrato das raízes, foram realizadas análises da posição e morfologia dos nódulos. Cada nódulo foi retirado com pinças de metal e colocado em tubo com sílica gel azul (4/8 mm) durante um mês para eliminar a umidade e evitar a presença de fungos.

Isolamento das bactérias dos nódulos das raízes de *Dalbergia ecastaphyllum*

No total, foram coletados 256 nódulos das raízes de *Dalbergia ecastaphyllum*. Os nódulos foram colocados individualmente em microtubos de 1,5 mL com água destilada autoclavada (1 mL) por um período de 1 h. Posteriormente, os nódulos foram macerados com pinças esterilizadas para serem isolados em placas de Petri com meio de cultura 79 (FREUD; WAKSMAN, 1928), também chamado meio de cultura YMA (VINCENT, 1970), onde adicionou-se 400 µL de fungicida comercial Nistatina. Foram estriados com alça de platina quatro nódulos por placa, que foram colocadas em estufa BOD a temperatura de 28 °C. Após o crescimento bacteriano, os microrganismos foram isolados individualmente. As placas foram incubadas novamente na BOD até o surgimento de colônias. Foram realizados sucessivos repiques até se obter colônias puras para posterior caracterização fenotípica.

Caracterização fenotípica dos isolados de bactérias

A caracterização fenotípica dos isolados foi feita mediante a observação das colônias bacterianas e seu tempo de crescimento (rápido: 1 a 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias; lento: 6 dias; muito lento: >10 dias). Também foi considerado: a alteração do pH no meio de cultura (ácido, neutro e alcalino), cor da colônia e produção de muco. Os dados das características fenotípicas foram analisados mediante uma matriz binária (1 – positivo e 0 – negativo) e os isolados foram agrupados pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard. A análise de agrupamento foi realizada empregando o programa PAST (HAMMER *et al.*, 2001).

Incubation of bacterial isolates in liquid culture medium

Eighteen bacteria that showed phenotypic characteristics of rhizobia from the collection were selected plus a commercial inoculant and a control test, totaling 20 treatments for the efficiency test that apparently fulfilled the desired characteristics with rhizobia, which were striated again in Petri dishes for growth in YMA culture medium. After bacterial growth, samples were placed in 240 ml glass vials previously sterilized in an autoclave with liquid culture medium (same culture medium as YMA, but without agar and without bromothymol blue) and left for 10 days on a shaker for growth in the liquid medium.

Inoculation of bacterial isolates in *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Vermiculite sterilized three times in an autoclave at a pressure of 120 PA for 40 minutes, with an interval of 48 h between sterilizations, was used in the nodulation test. Cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds and the 300 mL disposable cups were previously disinfected following the above mentioned methodology. Three cowpea seeds were sown per cup and each seed was inoculated with 1 mL of the suspension containing bacterial isolates and culture medium.

The experiment was carried out in a greenhouse at the Engineering and Agricultural Sciences (CECA) campus of the UFAL, irrigated with 30 mL of autoclaved distilled water every three days for 15 days (time necessary for the growth of plants and formation of root nodules). Four replications of the 18 selected bacteria were performed, plus a commercial inoculant and a control, thus totaling 80 samples (20 treatments x 4 replicates).

Analysis of results

For a better interpretation of the results obtained in the present work, data were presented in the form of graphs and tables prepared using the Microsoft® Excel® 2010 software.

Incubação dos isolados de bactérias em meio de cultura líquido

Foram selecionadas 18 bactérias que apresentaram características fenotípicas de rizóbios da coleção, mais um teste de inoculante comercial e um controle, num total de 20 tratamentos para o teste de eficiência que cumpriam aparentemente com as características desejadas com os rizóbios, as quais foram estriadas novamente em placas de Petri com meio de cultura YMA para seu crescimento. Após o crescimento bacteriano, as amostras foram colocadas em frascos de vidro de 240 mL previamente esterilizados em autoclave com meio de cultura líquido (mesmo meio de cultura do YMA, mas sem ágar e sem azul de bromotimol) e deixados durante 10 dias na máquina do Shaker para seu crescimento no meio líquido.

Inoculação dos isolados bacterianos em *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Para o teste de nodulação, foi utilizada vermiculita esterilizada três vezes na autoclave com pressão de 120 PA durante 40 minutos, com um intervalo de 48 h entre cada esterilização. Posteriormente, as sementes do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e os copos descartáveis de 300 mL foram desinfetados previamente seguindo a mesma metodologia mencionada anteriormente. Foram semeadas três sementes de feijão-caupi por copo e inoculando cada semente com 1 mL da suspensão contendo isolados bacterianos e meio de cultura.

O experimento foi montado em casa de vegetação no Campus de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA) da UFAL, irrigado com 30 mL de água destilada autoclavada a cada três dias, por 15 dias (tempo necessário para o crescimento das plantas e formação de nódulos nas raízes). Foram realizadas quatro repetições das 18 bactérias selecionadas, mais um inoculante comercial e um controle, obtendo um total de 80 amostras (20 tratamentos x 4 repetições).

Análise dos resultados

Para melhor interpretação dos resultados obtidos ao longo do presente trabalho, os dados foram apresentados sob a forma de gráficos e tabelas elaborados utilizando o programa Microsoft® Excel® 2010.

RESULTS AND DISCUSSION

Analyses of substrate samples from the Costa dos Corais, Alagoas, Brazil

The soil of the Costa dos Corais EPA can be characterized as oligotrophic with low values of phosphorus, potassium, iron, and organic matter (Table 1). This was expected because the area is an estuary with sandy soils in which the phosphorus content is a limiting factor for the nodulation process (GIONGO *et al.*, 2008). It can be assumed that the bacteria that occur in these areas are highly efficient in using this element. The soil in the area A1 was rich in sodium, since the percentage value of sodium was more than 15% and the pH was around 8.5. This area presented a notable large content of Mg ($1.5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$). As for areas A2 and A3, it was seen that Fe values were relatively lower than those of Area A1, and this may be related to the distance from the tide line. According to Youseif *et al.* (2017), poorly fertile soils, particularly sandy soils, have insufficient rhizobia to form efficient symbiotic relationships with legumes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises das amostras do substrato da zona da Costa dos Corais, Alagoas, Brasil

De acordo com as análises dos substratos da zona da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais, observou-se que o solo da região pode ser caracterizado como oligotrófico, com baixos valores de fósforo, potássio, ferro e matéria orgânica (Tabela 1). O que era esperado para área de estudo, uma vez que se trata de um estuário, com arenoso e o teor de fósforo no solo como nutriente limitante ao processo de nodulação (GIONGO *et al.*, 2008). Pode-se supor que as bactérias que ocorrem nessas áreas são altamente eficientes no uso desse elemento. O solo da área 1 é sódico, uma vez que o valor da porcentagem de sódio é maior que 15% e o pH está em torno de 8,5. Nesta área se destaca por apresentar grande quantidade de Mg ($1,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$). Em relação à áreas A2 e A3, pode-se observar que os valores de Fe são relativamente inferiores quando comparados com a Área 1, e isto pode estar relacionado com a distância da linha da maré. De acordo com Youseif *et al.* (2017), solos pouco férteis, particularmente solos arenosos, apresentam rizóbios insuficientes para formar relações simbióticas eficientes com leguminosas.

Table 1 - Chemical analysis of substrates from the three areas studied in the Costa dos Corais Environmental Protection Area, Alagoas, Brazil. Analyses carried out by the LDTA Analytical Center following the methodology of the Brazilian Agricultural Research Agency (EMBRAPA)

Tabela 1 - Análises físico-química do substrato de três áreas da Área de Proteção Ambiental Costa Dois Corais, Alagoas, Brasil. Análises realizadas pela Central Analítica LDTA. Com a metodologia da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias)

Physical-Chemical Factors	Area 1	Area 2	Area 3
pH	8.2	8.5	8.5
Na ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	152.0	53.0	49.0
P (mg dm^{-3})	1.0	2.0	2.0
K (mg dm^{-3})	42.0	29.0	33.0
Ca (mg dm^{-3})	1.9	1.9	2.2
Mg ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	1.5	0.8	0.7
Fe (mg dm^{-3})	0.33	0.03	0.06
MOT (g kg^{-1})	0.15	0.12	0.27

Na: Sodium; P: Phosphorus; K: Potassium; Ca: Calcium; Mg: Magnesium; Fe: Iron; TOM: Total Organic Matter.

Na: Sódio; P: Fósforo; K: Potássio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; Fe: Ferro; MOT: Matéria Orgânica Total.

Germination and analysis of nodules in roots of *Dalbergia ecastaphyllum*

The germination percentage of *Dalbergia ecastaphyllum* seeds was 100% in the substrates of the three areas of the Costa Dos Corais EPA (Figure 2). The average height of the germinated plants was similar between areas A1 (11.75 cm) and A2 (11.62 cm). The average height of plants in the area A3 averaged 14.66 cm, with a difference of 20% in relation to the other areas. This may indicate that the soil conditions in area A3, characterized by a higher content of organic matter in the substrate (0.27 g kg^{-1}), were more favorable for the development of *Dalbergia ecastaphyllum* seedlings. According to Chiodini *et al.* (2013), an adequate level of organic matter in the soil provides greater availability of nutrients for plants.

Germinação e análises dos nódulos em raízes de *Dalbergia ecastaphyllum*

A porcentagem de germinação das sementes de *Dalbergia ecastaphyllum* foi de 100% nos substratos das três áreas da APA Costa Dois Corais, Alagoas, Brasil (Figura 2). A altura média das plantas germinadas foi semelhante entre as áreas A1 (11,75 cm) e A2 (11,62 cm). A altura média de plantas da área 3 (A3) foi de 14,66 cm na altura das plantas, com diferença de 20% em relação à demais áreas. Isso pode indicar que as condições do solo da área 3, caracterizada por apresentar maior quantidade de matéria orgânica do substrato ($0,27 \text{ g kg}^{-1}$), foi melhor para o desenvolvimento das plântulas de *Dalbergia ecastaphyllum*. De acordo com Chiodini *et al.* (2013), nível adequado de matéria orgânica no solo proporciona maior disponibilidade de nutrientes para as plantas.



Figure 2 - *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. after germination.

Figura 2 - *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. após a germinação.

In this study, it was observed that *D. ecastaphyllum* has a great potential to establish symbiotic relationships with nitrogen-fixing bacteria. This was evident in the analysis of the roots, in which a large number of nodules were observed scattered throughout the root system in the three areas (Figure 3). In total, 256 nodules were identified in the roots of *D. ecastaphyllum* plants. Eight nodules in plants from A2 were rotted and cultivation for observation of bacterial colonies was not possible.

Neste estudo, foi possível observar que *D. ecastaphyllum* tem grande potencial em estabelecer relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio. Isso ficou evidente após a análise das raízes, onde se observou grande quantidade de nódulos dispersos em todo sistema radicular nas três áreas (Figura 3). No total, foram identificados 256 nódulos nas raízes das plantas de *D. ecastaphyllum*, sendo que oito nódulos da A2 estavam apodrecidos e não foi possível realizar sua repicagem para observação das colônias bacterianas.



Figure 3 - Occurrence of nodules in roots of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.

Figura 3 - Ocorrência de nódulos nas raízes de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.

Root nodules can contain, besides rhizobia, several non-nodulating endophytes which play an important role in the physiological processes of the host (THANUJA *et al.*, 2020). Another important fact is that many more rhizobia inhabit a plant's rhizosphere than the number of nodules formed, and this causes competition for the establishment of nodules (FRIESEN, 2012).

In total, the area A3 presented the highest number of nodules in *D. ecastaphyllum* followed by A2, while the area A1 presented the lowest number of nodules (Figure 4). This can be explained by the fact that the area A1 had the highest content of sodium ($152.0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$). According to Tavares *et al.* (2012), salinity reduced mycorrhizal colonization and root nodulation in seedlings of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., another legume species. Also, variations in the number of nodules can be attributed to several factors related to soil microbiota, as well as to abiotic factors that may have a direct or indirect influence, such as salinity, acidity, alkalinity, and soil temperature (YOUSEIF *et al.*, 2014).

Nódulos radiculares, além de apresentar rizóbios, também podem conter vários endófitos não nodulantes, que desempenham papel importante no processo fisiológico do hospedeiro (THANUJA *et al.*, 2020). Outro fato importante é que o número de rizóbios que habitam a rizosfera de uma planta é superior ao número de nódulos formados, e isso causa competição pelo estabelecimento de nodulações (FRIESEN, 2012).

No total, a A3 apresentou maior número de nódulos em *D. ecastaphyllum*, sendo seguida da A2, enquanto a A1 apresentou menor quantidade de nódulos (Figura 4). Isso pode ser explicado pelo fato da A1 ter apresentado a maior quantidade de sódio ($152,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$). De acordo com Tavares *et al.* (2012), a salinidade reduziu a colonização micorrízica e nodulação radicular de mudas de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., uma outra espécie de leguminosa. Além disso, as variações da quantidade de nódulos podem ser atribuídas a vários fatores relacionados com a microbiota do solo, bem como aos fatores abióticos que também podem influenciar direta ou indiretamente, tais como salinidade, acidez, alcalinidade e temperatura do solo (YOUSEIF *et al.*, 2014).

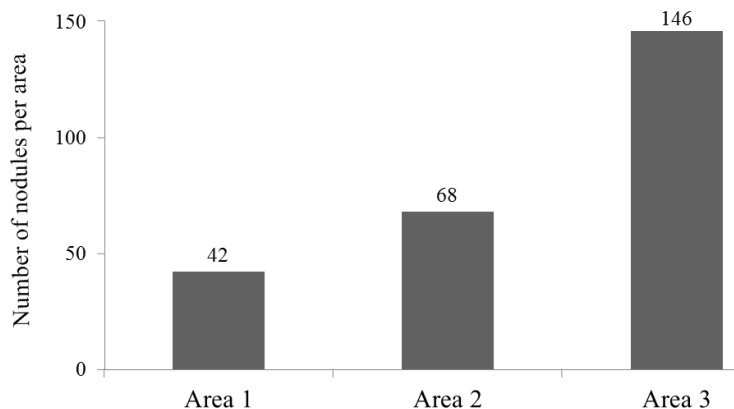


Figure 4 - Number of nodules identified in roots of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. per area (A1, A2, and A3).

Figura 4 - Número de nódulos identificados nas raízes de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. por área (A1, A2 e A3).

Phenotypic characterization of bacterial isolates

After nodules were transplanted, different characteristics in the bacterial colonies were observed between the three areas of the Costa Dos Corais EPA. In A1, it was observed that 17% of bacterial isolates showed fast growth and 8% intermediate growth. In A2, 30% of bacterial colonies showed fast growth and 35% intermediate growth. And, in A3, fast growth was seen in a greater number of colonies, around 53%, while intermediate growth was seen in about 57%. Thus, the highest growth rate of the bacteria was found in A3, followed by A2. Colonies from A2 showed the lowest growth percentages (Figure 5). The high salinity of the soils from A1 can be directly related to the low growth of bacterial colonies. Freitas *et al.* (2007) reported that rhizobia from saline soils in the semiarid region of Pernambuco were sensitive to salt concentrations of 16 g L⁻¹ and over.

Regarding the amount of mucus (low or high) presented by the bacterial colonies, it was found that bacteria in A1 had a high amount (21%), and only 6% low. Most of the bacterial isolates from A2 produced little mucus (36%), and about 29% had a high amount. The area A3 stood out in relation to the other areas, with 50% of the colonies producing high amount of mucus and 58% low (Figure 6).

Caracterização fenotípica dos isolados de bactérias

Após a repicagem dos nódulos, foi possível observar características diferentes nas colônias bacterianas entre as três áreas da APA Costa Dois Corais. Na A1, observou-se que 17% dos isolados bacterianos apresentaram crescimento rápido e 8% crescimento intermediário. Na A2, foi possível observar que 30% das colônias bacterianas apresentaram crescimento rápido e 35% intermediário. E, na A3, o crescimento rápido atingiu um ápice de cerca de 53% e o intermediário cerca de 57%. Assim, a taxa de crescimento mais alto das bactérias foi atribuída a A3, seguido pela A2. A A2 apresentou as porcentagens mais baixas de crescimento (Figura 5). O alto nível de salinidade do solo da A1 pode estar diretamente relacionado com o baixo crescimento das colônias bacterianas. Freitas *et al.* (2007) relataram que rizóbios oriundos de solos salinos da região semiárida de Pernambuco obtiveram sensibilidade a concentrações de sais a partir de 16 g L⁻¹.

Em relação a quantidade de muco (muito ou pouco) apresentado pelas colônias bacterianas, verificou-se que na A1 as bactérias apresentaram muito muco (21%), e apenas 6% exibiram uma quantidade inferior. A maioria dos isolados bacterianos da A2 produziram pouco muco (36%), e cerca de 29% apresentaram muito muco. As colônias bacterianas da A3 se destacaram em relação aos isolados das outras áreas, pois, foi observado uma quantidade de 50% de muito muco e 58% de pouco muco (Figura 6).

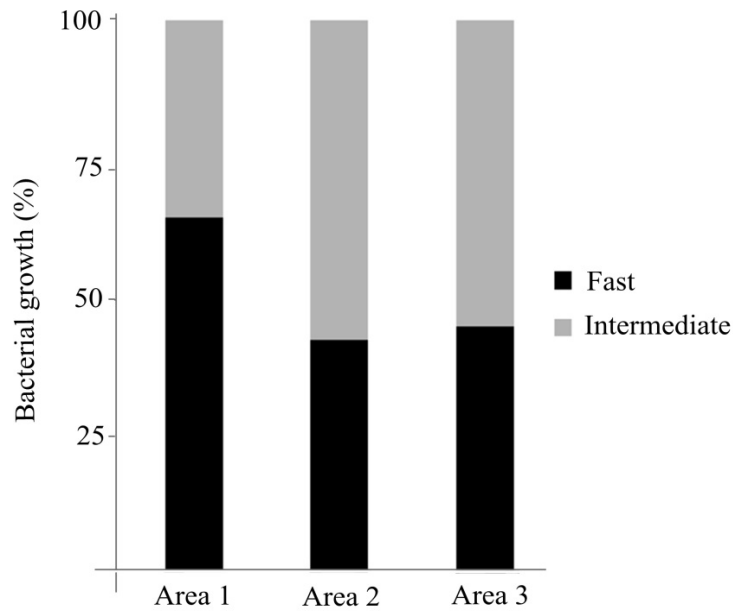


Figure 5 - Growth of bacterial isolates from the three areas studied in the Costa dos Corais Environmental Protection Area, Alagoas, Brazil.

Figura 5 - Crescimento dos isolados bacterianos das três áreas da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais, Alagoas, Brasil.

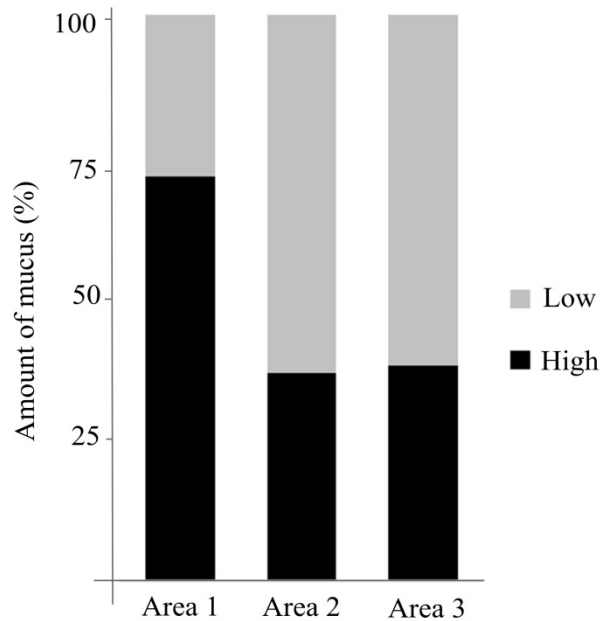


Figure 6 - Amount of mucus produced by bacterial isolates from the three areas studied in the Costa dos Corais Environmental Protection Area, Alagoas, Brazil.

Figura 6 - Quantidade de muco dos isolados bacterianos das três áreas da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais, Alagoas, Brasil.

The ability to produce high amounts of mucus is one of the characteristics that is involved in the process of adaptation and survival of rhizobia in adverse soil and climatic conditions (SILVA *et al.*, 2007). This means that the bacterial colonies that occur in A3 may have this greater capacity to produce mucus as an adaptation to environmental conditions.

As for the type of mucus (aqueous or thick), colonies from A1 presented 21% of aqueous mucus and 6% of thick mucus, while those from A2 presented 29% of aqueous mucus and 36% of thick mucus. Following the trend of the previous characteristics, bacterial colonies from A3 had 50% of aqueous mucus and 58% of thick mucus (Figure 7).

A alta capacidade de produção de muco é uma das características que está envolvida no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em condições adversas de solo e clima (SILVA *et al.*, 2007). Isso significa que as colônias bacterianas que ocorrem na A3 podem ter essa capacidade maior de produção de muco como forma de adaptação às condições do ambiente.

Quanto ao tipo de muco (aquoso ou consistente), as colônias bacterianas da A1 apresentaram 21% de muco aquoso e 6% de muco consistente, enquanto na A2 foi observado 29% de muco aquoso e 36% de muco consistente. Seguindo a tendência das características anteriores, a A3 obteve destaque com 50% de muco aquoso e 58% de muco consistente produzido pelas colônias bacterianas (Figura 7).

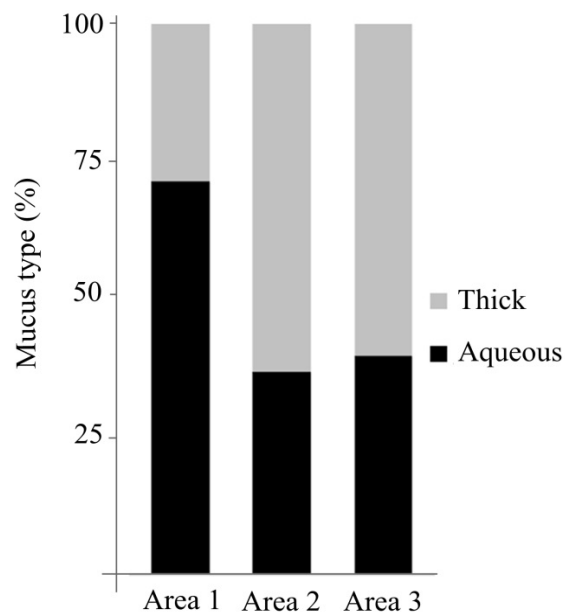


Figure 7 - Mucus type produced by bacterial isolates from the three areas studied in the Costa dos Corais Environmental Protection Area, Alagoas, Brazil.

Figura 7 - Tipo de muco dos isolados bacterianos das três áreas da Área de Proteção Ambiental A Costa dos Corais, Alagoas, Brasil.

The pH (acid, neutral or alkaline) presented by the bacterial colonies was also analyzed. In A1, the colonies showed 16% of acid pH, 11% of neutral pH, and 10% of alkaline pH. In A2, it was found that neutral pH was predominant among bacterial colonies with about 43% of the total, followed by alkaline (40%), and acid (6%). In A3, acid pH predominated (78%), followed by alkaline (50%), and neutral (46%) (Figure 8).

A classe de pH (ácido, neutro ou alcalino) apresentados pelas colônias bacterianas também foram analisados. Na A1, observou-se que as colônias apresentaram 16% de pH ácido, 11% de neutro e 10% de alcalino. Na A2, foi verificado que o pH neutro predominou entre as colônias bacterianas com cerca de 43% do total, seguido pelos pH alcalino (40%) e ácido (6%). Na A3, o pH com representação mais elevada entre as colônias bacterianas foi o ácido (78%), seguido pelos pH alcalino (50%) e neutro (46%) (Figura 8).

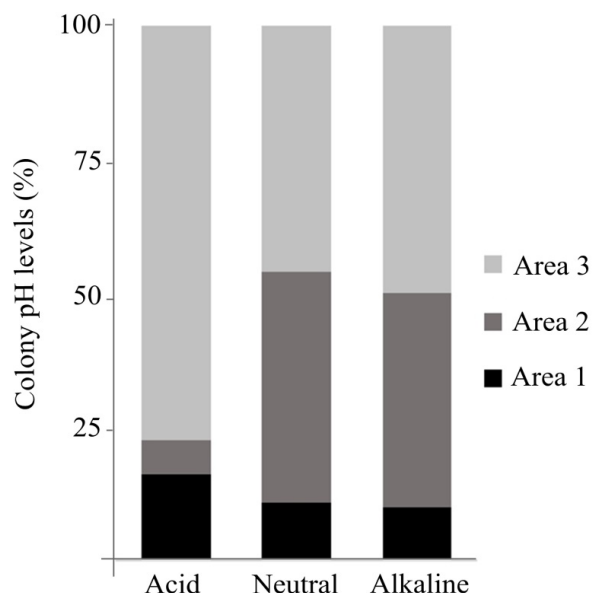


Figure 8 - pH range of bacterial colonies from the three areas studied in the Costa dos Corais Environmental Protection Area, Alagoas, Brazil.

Figura 8 - Níveis de pH das colônias bacterianas das três áreas da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais, Alagoas, Brasil.

It is important to remember that the soil collected in the three areas had an alkaline pH, varying between 8.2 and 8.5 (Table 1). According to Khaitov *et al.* (2016), rhizobia are important to improve soil fertility, but effective inoculants that adapt to saline soils are not easy to obtain.

Regarding the color of the bacteria (yellow, white or pink), 17% of the bacterial colonies from A1 were yellow, 20% white, and 2% pink; 22% of the colonies from A2 were yellow, 25% white, and 47% pink; and 61% of the colonies from A3 were yellow, 55% white and 51% pink (Figure 9).

In total, 17 phenotypic types of bacterial isolates were identified, of which eight had fast growth and nine intermediate growth; seven presented acid pH, eight neutral pH, and two alkaline pH; five presented yellow-colored bacteria, seven white, and five pink. The phenotypic characteristics of the mucus (quantity and consistency) were correlated and had the same values, with seven phenotypic types corresponding to the characteristics with high amount of aqueous mucus, and the phenotypic characteristics with little amount of thick mucus were observed in 10 phenotypic types (Table 2).

É importante lembrar que o solo coletado nas três áreas apresentou pH alcalino, variando entre 8,2 e 8,5 (Tabela 1). De acordo com Khaitov *et al.* (2016), os rizóbios são importantes para melhorar a fertilidade do solo, porém, é difícil obter inoculantes eficazes que se adaptem a solos salinos.

Em relação a coloração das bactérias (amarelo, branco ou rosa), a A1 apresentou 17% das colônias bacterianas de cor amarela, 20% de cor branca e 2% de cor rosa, enquanto a A2 apresentou 22% de cor amarela, 25% de cor branca e 47% de cor rosa. As colônias bacterianas da A3 foram caracterizadas por apresentarem 61% de cor amarela, 55% de cor branca e 51% de cor rosa (Figura 9).

No total, foram identificados 17 tipos fenotípicos dos isolados bacterianos, dos quais oito são de crescimento rápido e nove de crescimento intermediário, sete são de pH ácido, oito são de pH neutro e dois são de pH alcalino, cinco são de bactérias com coloração amarela, sete de coloração branca e cinco de cor rosa. Os resultados obtidos nas características fenotípicas de muco (quantidade e consistência) estão correlacionados e tem os mesmos valores, sendo sete tipos fenotípicos correspondentes das características com muito muco e aquoso, e as características fenotípicas com pouco muco e consistente foram observados em 10 tipos fenotípicos (Tabela 2).

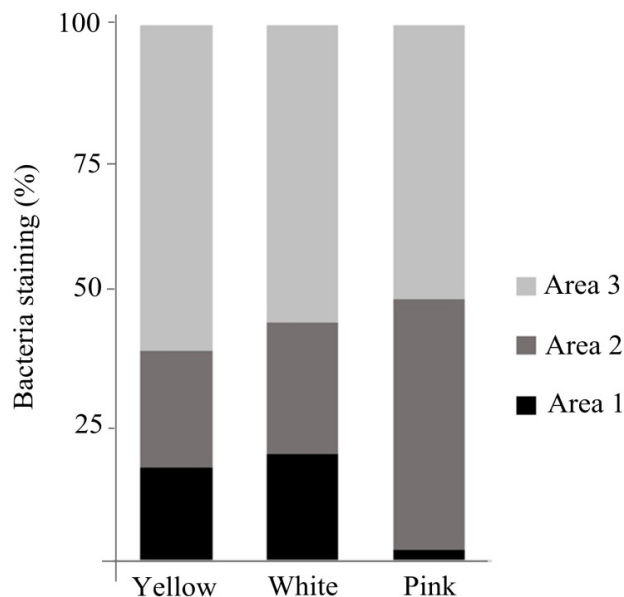


Figure 9 - Staining of bacterial isolates from from the three areas studied in the Costa dos Corais Environmental Protection Area, Alagoas, Brazil.

Figura 9 - Coloração dos isolados bacterianos das três áreas da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais, Alagoas, Brasil.

Table 2 - Characteristics of bacterial isolates according to phenotypic groups

Tabela 2 - Características dos isolados de bactérias de acordo com seus grupos fenotípicos

Phenotype	Bacterial growth	pH	Amount of mucus	Bacteria staining	Consistency of mucus
F1	Fast	Acid	High	Yellow	Aqueous
F2	Fast	Acid	High	White	Aqueous
F3	Fast	Neutral	High	White	Aqueous
F4	Fast	Alkaline	High	White	Aqueous
F5	Fast	Neutral	High	Yellow	Aqueous
F6	Intermediate	Neutral	High	White	Aqueous
F7	Intermediate	Acid	High	White	Aqueous
F8	Fast	Acid	Low	Yellow	Thick
F9	Intermediate	Acid	Low	Yellow	Thick
F10	Intermediate	Acid	Low	Pink	Thick
F11	Intermediate	Acid	Low	White	Thick
F12	Intermediate	Neutral	Low	Pink	Thick
F13	Intermediate	Neutral	Low	Yellow	Thick
F14	Intermediate	Neutral	Low	Pink	Aqueous
F15	Intermediate	Alkaline	Low	Pink	Thick
F16	Fast	Neutral	Low	White	Thick
F17	Fast	Neutral	Low	Pink	Thick

Currently, phenotype-based taxonomy is validated or refuted by genetic or genomic analyses (ORMENO-ORRILLO; MARTÍNEZ-ROMERO, 2013). Thus, the results observed in the present work are important to guide future studies on the identification of rhizobia species occurring in root nodules of *D. ecastaphyllum*.

Nodulation test of isolates in *Vigna unguiculata* (L.) Walp

The germination rate of the 76 seeds of *Vigna unguiculata* inoculated with 19 bacterial isolates was 57%. Nodules were found in plants inoculated with eight isolates, of which seven were from nodules of *Dalbergia ecastaphyllum*, and one from commercial inoculant (positive control). No nodules were seen in the negative control, indicating absence of contamination.

In this experiment, only the nodulation capacity of cowpea strains was measured. Heavy rains that occurred during the experiment caused a leak in the greenhouse and the rotting of some treatment replicates. Assuming the limitation of the experiment and believing that the cowpea presents early nodulation, it is possible that longer experiments result in formation of nodules in all strains of *V. unguiculata*. According to a study by Ndungu *et al.* (2018), the richness of cowpea nodule symbionts was considered high due to its ease to establish symbiotic relationships with several different species of the genus *Bradyrhizobium*.

According to the results obtained in this study, it can be said that this is the first record of rhizobia obtained from nodules of *D. ecastaphyllum* and inoculated in cowpea (*Vigna unguiculata*). Although the experiment was terminated at an early moment, the presence of nodules promoted by eight of the 18 bacteria (17 native and the commercial inoculant), suggest the possibility that some of these rhizobia are of agricultural importance. Further experiments evaluating not only nodulation but also the efficiency and identification of these inoculants need to be performed.

Atualmente, a taxonomia baseada em fenótipo é validada ou refutada por análise genética ou genômica (ORMENO-ORRILLO; MARTÍNEZ-ROMERO, 2013), desta forma, os resultados observados no presente trabalho são importantes para direcionar estudos futuros sobre a identificação de espécies de rizóbios que ocorrem em nódulos radiculares de *D. ecastaphyllum*.

Teste de nodulação dos isolados em *Vigna unguiculata* (L.) Walp

A taxa de germinação das 76 sementes de *Vigna unguiculata* inoculadas com 19 isolados bacterianos foi de 57%. Verificou-se presença de nódulos para plantas inoculadas com oito isolados, sendo sete obtidos de nódulos de *Dalbergia ecastaphyllum* e um inoculante comercial (controle positivo). Não houve presença de nódulos no controle negativo, indicando a não ocorrência de contaminação.

Neste experimento foi medida apenas a capacidade de nodulação das estirpes do feijão-caupi. Fortes chuvas ocorridas no período do experimento provocaram vazamento na casa de vegetação, o que causou o apodrecimento de algumas repetições de tratamentos. Admitindo-se a limitação do experimento e acreditando que o feijão-caupi apresente nodulação precoce, é possível que com um maior tempo de experimento haja a formação de nódulos em todas as estirpes *V. unguiculata*. De acordo com um estudo realizado por Ndungu *et al.* (2018), a riqueza de simbiontes de nódulos de feijão-caupi foi considerada elevada devido sua facilidade de estabelecer relações simbióticas com várias espécies diferentes do gênero *Bradyrhizobium*.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, pode-se afirmar que esse é o primeiro registro de rizóbios obtidos em nódulos de *D. ecastaphyllum* e inoculados em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Embora o experimento tenha sido interrompido precocemente, a presença de nódulos proporcionados por oito das 18 bactérias (17 nativas e o inoculante comercial), sugerem a possibilidade de que alguns desses rizóbios apresentem importância agrícola. Para isso, um novo experimento que avalie não só a nodulação, mas a eficiência e a identificação destes inoculantes precisa ser realizado.

CONCLUSIONS

Dalbergia ecastaphyllum presented nodules in soils of the coastal zone of the Costa dos Corais EPA;

Dalbergia ecastaphyllum is symbiotically associated with populations of phenotypically diverse bacteria, mainly of neutral pH, producing little and aqueous mucus, forming white colonies, and presenting intermediate growth time;

The number of nodules varies depending on the distance from the tide line;

Some bacterial isolates have the ability to nodulate *Vigna unguiculata* (cowpea).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) of the Federal University of Alagoas (UFAL) for the support provided to this research. This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Financing Code 001, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CONCLUSÕES

Dalbergia ecastaphyllum apresentou nódulos em solos da zona costeira da APA Costa dos Corais;

Dalbergia ecastaphyllum associa-se simbioticamente com populações de bactérias fenotipicamente diversas, principalmente com aquelas que apresentam pH neutro, pouco muco e aquoso, coloração das colônias branca, e tempo de crescimento intermediário;

O número de nódulos varia em função da distância da linha de maré;

Alguns dos isolados bacterianos apresentam capacidade de nodular o *Vigna unguiculata* (feijão-caupi).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) pelo apoio para o desenvolvimento desta pesquisa. Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financiamento 001, bem como do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

BONALDI, R. A.; RODERJAN, C. V. Levantamento florístico e caracterização estrutural de um manguezal na APA de Guaraqueçaba, Paranaguá, PR. **Acta Biológica Catarinense**, v. 4, n. 1, p. 19-28, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21726/abc.v4i1.259>

CAMARGO, R. A. **A tribo Dalbergieae (Leguminosae - Faboideae) no estado de Santa Catarina, Brasil**. 2005. 153f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHIODINI, B. M.; SILVA, A. D.; NEGREIROS, A. B.; MAGALHÃES, L. B. Matéria orgânica e a sua influência na nutrição de plantas. **Revista Cultivando o Saber**, v. 6, n. 1, p. 181-190, 2013.

DICENZO, G. C.; ZAMANI, M.; CHECCUCCI, A.; FONDI, M.; GRIFFITTS, J. S.; FINAN, T. M.; MENGONI, A. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 1-33, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0377>

FILARDI, F. L. R.; LIMA, H. C.; CARDOSO, D. B. O. S. ***Dalbergia* in Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB83014>>. Acesso em: 14 jan. 2021

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052007000300017>

FREUD, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York, McGraw-Hill Book Company, 143p. 1928.

FRIESEN, M. L. Widespread fitness alignment in the legume-rhizobium symbiosis. **New Phytologist**, v. 194, n. 4, p. 1096-1111, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04099.x>

- GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L. K.; FREIRE, J. R. J.; BODANESE- ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**, v. 38, n. 3, p. 261-269, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.10.016>
- GOURION, B.; BERRABAH, F.; RATET, P.; STACEY, G. *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. **Trends in plant science**, v. 20, n. 3, p. 186-194, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.008>
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- KHAI TOV, B.; KURBONOV, A.; ABDIEV, A.; ADILOV, M. Effect of chickpea in association with *Rhizobium* to crop productivity and soil fertility. **Eurasian Journal of Soil Science**, v. 5, n. 2, p. 105-112, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.18393/ejss.2016.2.105-112>
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens. 577p. 2005.
- LU, J. K.; HE, X. H.; HUANG, L. B.; KANG, L. H.; XU, D. P. Two *Burkholderia* strains from nodules of *Dalbergia odorifera* T. Chen in Hainan Island, southern China. **New Forests**, v. 43, n. 4, p. 397-409, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-011-9290-8>
- MACHADO, D. F. T.; CONFESSOR, J. G.; RODRIGUES, S. C. Processo inicial de recuperação de área degradada a partir de intervenções físicas e utilização de leguminosas. **Caderno de Geografia**, v. 24, n. 1, p. 42-54, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5752/P.2318-2962.2014v24nespp42>
- MATA, V.; COSTA, M. A.; MORAIS, D.; CARVALHO, C. A. Germinação de sementes de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taubert sob diferentes temperaturas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 1832, 2014.
- MORAIS, D. V.; NUNES, L. A.; MATA, V. P.; COSTA, M. A. P. C.; SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. Leaf geometric morphometrics among populations of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 6, p. 1789-1798, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v35n6a2019-39814>
- MOREIRA, F. M. D. S.; COELHO, K. P.; RIBEIRO, P. R. D. A.; GUIMARAES, A. A. Nursery growth and rhizobia symbiosis of scandent Leguminosae species native to the Amazon region. **Acta Amazônica**, v. 46, n. 4, p. 367-376, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600392>
- NDUNGU, S. M.; MESSMER, M. M.; ZIEGLER, D.; GAMPER, H. A.; MÉSZÁROS, É.; THUITA, M.; THONAR, C. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 261, p. 161-171, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.014>
- NOGUEIRA, N. O.; OLIVEIRA, O. D.; MARTINS, C. D. S.; BERNARDES, C. D. O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia biosfera**, v. 8, n. 14, p. 2012-2031, 2012.
- ORMENO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phenotypic tests in *Rhizobium* species description: an opinion and (a sympatric speciation) hypothesis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 145-147, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2012.11.009>
- PARKER, M. A.; ROUSTEAU, A. Mosaic origins of *Bradyrhizobium* legume symbionts on the Caribbean island of Guadeloupe. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 77, p. 110-115, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.011>
- RASOLOMAMPINANINA, R.; BAILLY, X.; FETIARISON, R.; RABEVOHITRA, R.; BÉNA, G.; RAMAROSON, L.; RAHERIMANDIMBY, M.; MOULIN, L.; LAJUDIE, P.; DREYFUS, B.; AVARRE, J. C. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to α - and β -Proteobacteria. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 4135-4146, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02730.x>
- RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LOPEZ-LOPEZ, A.; ORMENO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F. G.; MARTÍNEZ, J.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1179-1184, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032912-0>

- SAHA, S.; SHILPI, J. A.; MONDAL, H.; HOSSAIN, F.; ANISUZZMAN, M.; HASAN, M. M.; CORDELL, G. A. Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae). **Phytopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 291-346, 2013.
- SCHWEMBER, A. R.; SCHULZE, J.; DEL POZO, A.; CABEZA, R. A. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 333, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8090333>
- SILVA, V. N.; FIGUEIREDO, M. D. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 1, p. 16-21, 2007.
- SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. S. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 93-114, 2013.
- SPRENT, J. I.; ARDLEY, J. K.; JAMES, E. K. From North to South: a latitudinal look at legume nodulation processes. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 31-41, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.011>
- TAVARES, R. C.; MENDES FILHO, P. F.; LACERDA, C. F. D.; SILVA, J. Colonização micorrízica e nodulação radicular em mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) sob diferentes níveis de salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 3, p. 409-416, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000300001>
- THANUJA, K. G.; ANNADURAI, B.; THANKAPPAN, S.; UTHANDI, S. Non-rhizobial endophytic (NRE) yeasts assist nodulation of *Rhizobium* in root nodules of blackgram (*Vigna mungo* L.). **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 10, p. 2739-2749, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01983-z>
- VATANPARAST, M.; KLITGÅRD, B. B.; ADEMA, F. A.; PENNINGTON, R. T.; YAHARA, T.; KAJITA, T. First molecular phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia*: implications for infrageneric circumscription and biogeography. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 143-149, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.001>
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 119p., 1970.
- YOUSEIF, S. H.; ABD EL-MEGEED, F. H.; AGEEZ, A.; MOHAMED, Z. K.; SHAMSELDIN, A.; SALEH, S. A. Phenotypic characteristics and genetic diversity of rhizobia nodulating soybean in Egyptian soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 60, p. 34-43, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.10.008>
- YOUSEIF, S. H.; EL-MEGEED, A.; FAYROUZ, H.; SALEH, S. A. Improvement of faba bean yield using *Rhizobium/Agrobacterium* inoculant in low-fertility sandy soil. **Agronomy**, v. 7, n. 1, p. 2, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy7010002>