

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA EM PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO  
VEGETAL DE BACTÉRIAS DE SOLOS DA CAATINGA PERNAMBUCANA  
ORIUNDAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS NATIVAS**

**DALILA RIBEIRO RODRIGUES**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**

**CAMPINA GRANDE-PB**

**ABRIL DE 2016**

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA EM PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO  
VEGETAL DE BACTÉRIAS DE SOLOS DA CAATINGA PERNAMBUCANA  
ORIUNDAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS NATIVAS**

**DALILA RIBEIRO RODRIGUES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências do componente curricular da disciplina de seminário da pesquisa / Área de Concentração: Agricultura Familiar e Sustentabilidade

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior**

**CAMPINA GRANDE- PB**

**ABRIL DE 2016**

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

R696d Rodrigues, Dailia Ribeiro  
Diversidade e eficiência em promoção do crescimento vegetal de bactérias de solos da caatinga pernambucana oriundas de nódulos de leguminosas arbóreas nativas [manuscrito] / Dailia Ribeiro Rodrigues. - 2016.  
79 p. : Il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

1. Caatinga. 2. Leguminosas arbóreas. 3. Fixação Biológica de Nitrogênio. 4. Rizóbio. I. Título.


21. ed. CDD 633.3

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA EM PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO  
VEGETAL DE BACTÉRIAS DE SOLOS DA CAATINGA PERNAMBUCANA  
ORIUNDAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS NATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências do componente curricular da disciplina de seminário da pesquisa / Área de Concentração Agricultura Familiar e Sustentabilidade

Aprovada em 01 de Abril de 2016


**Banca examinadora**



**Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior (D.Sc., Ciência de Solo)**

**Embrapa Semiárido**

**Orientador**



**Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia (D.Sc., Genética)**

**UFRGS**

**Examinadora**



**Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Menezes (D.Sc., Biotecnologia Vegetal)**

**UEPB**

**Examinador**

*Aos meus pais, Evani e Ademar, o meu irmão  
Danilo e ao meu noivo Pedro Victor,  
principais incentivadores na realização deste  
sonho.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, criador da vida, minha fonte de sabedoria, o meu sustento e fortaleza para que eu pudesse alcançar com vitórias todos os meus objetivos;

Aos meus pais, Evani e Ademar, por terem me dado a vida e que sempre fizeram de tudo para que ela valesse a pena. Me instruíram no caminho certo, me apoiaram a cada decisão que me fizesse feliz, sem vocês nada disso seria possível. Obrigado por toda dedicação em prol da minha felicidade;

Ao meu irmão, Danilo, meu companheiro desde de sempre e para sempre, que apesar de ser mais novo, por tantas vezes se portou como irmão mais velho me encorajando e me aconselhando a continuar firme e forte;

Ao meu noivo, Pedro Victor, por todo amor, apoio, dedicação e companheirismo, não permitindo que eu fraquejasse nas horas mais difíceis, sem você eu não teria chegado nem na metade de onde cheguei. Obrigada meu amor, por não ter desistido de mim quando eu já não via uma saída, essa conquista hoje é sua também!

A toda minha família, avós, tios (as), primos (as), obrigado por serem o meu porto seguro, e a uma pessoa em especial a minha tia Caçula, que sempre me incentivou para eu alcançar os meus objetivos, me dando força para continuar nessa árdua trajetória;

Ao meu orientador, Dr. Paulo Ivan, por toda orientação concebida e pela oportunidade de adquirir conhecimentos;

A minha “mãezinha Indra”, meu anjo da guarda, por todos os puxões de orelha, socorros e por ser a calma em momentos de aflições, quando a genética começava a dar errado, rs. Obrigado por tudo mesmo;

A professora Dra. Lindete, por todo carinho e conselhos recebidos durante a disciplina e no período do estágio;

A toda equipe dos laboratórios de Microbiologia do solo e Controle biológico, de forma especial aos técnicos Herbert e Sr. Luís, obrigado por toda força;

As minhas “Carimba que é Top”, amigas que a Embrapa me presenteou. Obrigada meninas por toda a força para que esse momento se concretizasse com um final feliz;

A Idaline, minha irmã de orientação, por todo auxílio, apoio e por me tirar inúmeras vezes do sufoco quando eu só via números e não enxergava os resultados, rs;

A Universidade Estadual da Paraíba, Campus I, juntamente com a EMBRAPA Algodão, em especial o Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela oportunidade oferecida em realizar o curso de Mestrado;

A todos os membros do Mestrado em Ciências Agrárias, professores, secretário e aos outros Discentes, especialmente as garotas, vocês foram a minha família na Paraíba.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho e ao CNPq pelo apoio financeiro da pesquisa;

Enfim, sou grata a todos que de forma direta ou indiretamente se fizeram presentes para execução deste trabalho e para que mais uma etapa da minha vida acadêmica fosse concluída, muito obrigada!!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar, mas, o  
mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

**Madre Teresa de Calcutá**



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
3.1 O BIOMA CAATINGA .....	8
3.1.1 <i>Leguminosas arbóreas da Caatinga, Família Fabaceae (Leguminosae)</i> .....	10
3.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN).....	12
3.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM LEGUMINOSAS.....	15
3.4 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM LEGUMINOSAS.....	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS .....	21
4.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS.....	21
4.2.1 <i>Seleção dos isolados por meio da amplificação simultânea de fragmentos dos genes nifH e nodC</i> .....	22

4.2.2 <i>Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) das bactérias isoladas do angico e da jurema-preta</i> .....	23
4.2.3 <i>Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análises filogenéticas das bactérias isoladas do mulungu</i> .....	24
4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA .....	24
4.3.1 <i>Tolerância à salinidade no meio de cultura e incubação em diferentes temperaturas</i> .....	24
4.3.2 <i>Avaliação da produção de compostos indólicos e solubilização de tri-fosfato de cálcio “in vitro”</i> .....	25
4.3.3 <i>Capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e testes enzimáticos por meio do kit API 20 NE</i> .....	26
4.4 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DOS ISOLADOS EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO .....	27
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
5.1 AMPLIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE FRAGMENTOS DOS GENES <i>NIFH</i> E <i>NODC</i> COMO FERRAMENTA PARA A SELEÇÃO PRELIMINAR DAS BACTÉRIAS. ....	29
5.2 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS E CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE TRI-FOSFATO DE CÁLCIO “IN VITRO” .....	31
5.3 TOLERÂNCIA A TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl NO MEIO SÓLIDO.....	37
5.4 CAPACIDADE DE UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E TESTES ENZIMÁTICOS POR MEIO DO KIT API PARA OS ISOLADOS DE MULUNGU.....	40
5.5 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO DNA RIBOSSOMAL AMPLIFICADO (ARDRA) DOS ISSOLADOS DE ANGICO E JUREMA-PRETA.....	42
5.6 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S RRNA E ANÁLISES FILOGENÉTICAS DE ISOLADOS DO MULUNGU.....	46
5.7 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DOS ISOLADOS DE ANGICO E MULUNGU EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	48
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>53</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO E PRODUÇÃO DO AIA COM (AIA CT) E SEM (AIA ST) L-TRIPTOFANO COMO PRECURSOR POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE MULUNGU.....	31
<b>TABELA 2.</b> CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO E PRODUÇÃO DO AIA COM (AIA CT) E SEM (AIA ST) L-TRIPTOFANO COMO PRECURSOR POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE ANGICO.....	32
<b>TABELA 3.</b> CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO E PRODUÇÃO DO AIA COM (AIA CT) E SEM (AIA ST) L-TRIPTOFANO COMO PRECURSOR POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE JUREMA-PRETA.....	33
<b>TABELA 4.</b> ISOLADOS DE MULUNGU (M), ANGICO (A) E JUREMA-PRETA (J) TOLERANTES A DIFERENTES FAIXAS DE TEMPERATURAS E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SALINIDADE.....	39
<b>TABELA 5.</b> BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE MULUNGU ANALISADAS QUANTO A CAPACIDADE DE METABOLIZAR DIFERENTES FONTES DE CARBONO (+ = METABOLIZA; - = NÃO METABOLIZA).....	41
<b>TABELA 6.</b> PERFIS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA IDENTIFICADAS POR API 20NE EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE MULUNGU.....	42
<b>TABELA 7.</b> PRODUÇÃO DE MASSA DE PARTE AÉREA SECA (MPAS), MASSA DE RAIZ SECA (MRS), MASSA DE NÓDULOS SECOS (MNS), NÚMERO DE NÓDULOS (NN) E O ACUMULO DE NITROGÊNIO NA PARTE AÉREA (N TOTAL) OBTIDOS NO ENSAIO DE NODULAÇÃO DO ANGICO.....	49
<b>TABELA 8.</b> PRODUÇÃO DE MASSA DE PARTE AÉREA SECA (MPAS), MASSA DE RAIZ SECA (MRS), MASSA DE NÓDULOS SECOS (MNS), NÚMERO DE NÓDULOS (NN) E O ACUMULO DE NITROGÊNIO NA PARTE AÉREA (N TOTAL) OBTIDOS NO ENSAIO DE NODULAÇÃO DO MULUNGU.....	51

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *NIFH* E/OU *NODC* (M= MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB; 1= BRANCO; 2, 3 E 4= CONTROLES POSITIVOS; 5 À 46= ISOLADOS ALEATÓRIOS) EM ISOLADOS PROVENIENTES DE NÓDULOS DE MULUNGU, ANGICO E JUREMA-PRETA.....30
- FIGURA 2.** AMPLIFICAÇÃO DO GENE *NODC* UTILIZANDO UM PAR DE INICIADORES NODCFORBURK E NODCREVBURK PARA OS ISOLADOS RIZOBIANOS DE ANGICO E JUREMA-PRETA.....30
- FIGURA 3.** ESQUEMA UTILIZADO PARA CÁLCULO DO ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO [I.S.= DIÂMETRO DO HALO(DH)/DIÂMETRO DA COLÔNIA(DC)].....35
- FIGURA 4.** DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE ANGICO (A) E JUREMA-PRETA (B) CONSTRUÍDOS A PARTIR DE PERFIS DE RESTRIÇÃO DO GENE 16SRRNA UTILIZANDO AS ENDONUCLEASES HINFI, MSPI E HHA1. DENDROGRAMA CONSTRUÍDO UTILIZANDO O MÉTODO UPGMA E O COEFICIENTE DE JACCARD.....45
- FIGURA 5.** ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE 16S RRNA DOS DE 13 ISOLADOS BACTERIANOS DE MULUNGU E OUTRAS SEQUÊNCIAS DE ESTIRPES DE RIZÓBIO DISPONÍVEIS NO GENBANK. O MÉTODO DE AGRUPAMENTO UTILIZADO FOI O NEIGHBOUR-JOINING COM O ALGORÍTIMO JUKES-CANTOR. OS NÚMEROS NOS NÓS DA ÁRVORE REPRESENTAM OS VALORES DE BOOTSTRAP (1000 RÉPLICAS) SUPERIORES A 50%.....47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA – Ácido Indol-3-acético

ATP – Adenosina Trifosfato

ARDRA – Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado

CMISA - Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido

DAE – Dias após a emergência

DC – Diâmetro da colônia

DH – Diâmetro do Halo

DO – Densidade óptica

FBN – Fixação biológica de nitrogênio

GL – Glicose Extrato de Levedura

IAM - indol-3-acetamida

IpyA - indol-3-piruvato

IS – Índice de solubilização

MAPA – Ministério de agricultura, pecuária e abastecimento

MNS – Massa de nódulos secos

MPAS – Massa de parte aérea seca

MRS – Massa da raiz seca

N – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de sódio

NN – número de nódulos

NH<sub>3</sub> - Amônia

N<sub>2</sub> – Di-Nitrogênio

P - Fósforo

PCR – Reações de cadeia polimerase

TAM - triptamina

## RESUMO

RODRIGUES, DALILA RIBEIRO. M.Sc., Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, abril de 2016. **Diversidade e eficiência em promoção do crescimento vegetal de bactérias de solos da caatinga pernambucana oriundas de nódulos de leguminosas arbóreas nativas.** Campina Grande, PB, 2015. 79p Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

A utilização de leguminosas inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio nativas eficientes e competitivas representa uma estratégia para potencializar as práticas na regeneração de áreas degradadas. Além de favorecer o estabelecimento das plantas, a utilização de estirpes eficientes reduz os custos da implantação e manutenção dos sistemas agrícolas, dispensando a utilização de fertilizantes químicos nitrogenados. Mas, para o sucesso destas práticas é preciso conhecer a diversidade das bactérias presentes nos nódulos de tais espécies de leguminosas e sua devida eficiência. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e eficiência de bactérias oriundas de solos do Estado de Pernambuco e isoladas de nódulos de três espécies leguminosas arbóreas nativas da Caatinga, depositadas na Coleção de Microorganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido. Após certificação da pureza do estoque de bactérias, os isolados passaram por uma seleção através da amplificação de fragmentos dos genes *nodC* e *nifH* utilizando a abordagem de duplex PCR. Apresentaram amplificação positiva 18 isolados de mulungu, 40 de jurema-preta e 44 de angico, esses isolados foram avaliados quanto a tolerância de NaCl e altas temperaturas “in vitro”, habilidade de metabolizar diferentes fontes de carbono e atividade enzimática (apenas isolados de mulungu), sua capacidade de promoção do crescimento vegetal, através da produção do

Ácido indol-acético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio e, por fim, foram testados em casa de vegetação com as plantas hospedeiras originais, para determinação da eficiência simbiótica. Os isolados do mulungu mostraram variabilidade para atividade enzimática e para metabolização das fontes de carbono. Cinco isolados de mulungu e jurema-preta e 6 isolados de angico foram capazes de produzir AIA, na presença do L-triptofano, acima da estirpe de referência. Quanto ao potencial de solubilização de fosfato de cálcio apenas um isolado de mulungu apresentou valor igual a estirpe de referência, sete isolados de jurema-preta e dois de angico, solubilizaram fosfato de cálcio acima do valor da referência. Para cada espécie existem representantes potenciais na tolerância de altas temperaturas e altos teores salinos. Os isolados de angico e jurema-preta com características promíscuas foram submetidos ao ARDRA, utilizando três enzimas de restrição *MspI*, *HinfI* e *HhaI*, gerando para o angico um grande grupo com aproximadamente 40% de similaridade e para juremapreta um principal grupo com 65% de similaridade entre os isolados, constatando então a presença da diversidade dentre os isolados. Nos testes de autenticidade, 22 isolados de angico e 10 de mulungu foram capazes de renodular a estirpe hospedeira e o isolado A27, é eficiente na fixação biológica de nitrogênio, quando comparado ao controle nitrogenado. As bactérias do mulungu que se destacaram tiveram o gene 16S do rRNA parcialmente sequenciado para determinar o posicionamento taxonômico.

**Palavras-chave:** Fixação Biológica de nitrogênio. Reflorestamento de áreas degradadas. Rizóbio.



## ABSTRACT

RODRIGUES, DALILA RIBEIRO. M.Sc., Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, abril de 2016. **Diversity and efficiency in promoting plant growth of soil bacteria Pernambuco Caatinga derived from native legume nodules.** Campina Grande, PB, 2015. 79p. Dissertation (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Advisor: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

The use of legumes inoculated with competitive and efficient nitrogen-fixing bacteria is a strategy to enhance the practices in the regeneration of degraded areas. In addition to encouraging the establishment of plants, the use of efficient strains reduces the cost of deployment and maintenance of agricultural systems, eliminating the use of nitrogenous fertilizers. But for the success of these practices is necessary to know the diversity of bacteria in the legumes nodules and evaluate their proper efficiency. The objective of this study was to evaluate the diversity and efficiency of bacterial isolates from three native species nodules Caatinga, grown in the State of Pernambuco soils deposited in the Agricultural Interest Collection of Microorganisms of Embrapa Semi-Arid. After certification purity of the stock of bacteria, all 308 isolates passed through a selection of amplicons *nodC* and *nifH* genes using a duplex-PCR approach. Among the bacteria evaluated, positive amplification were obtained for 18 isolated from mulungu, 40 to jurema-preta and 44 to angico. All these isolates were evaluated for NaCl tolerance and high temperatures "in vitro", ability to metabolize different carbon sources and enzymatic activity (only bacteria from mulungu), their "in vitro" plant growth promotion mechanisms by means of the production of indole acetic acid (IAA) and calcium phosphate solubilization and finally tested in the greenhouse with the original 2

host plants, to determine the symbiotic efficiency of the isolates. Isolates of mulungu showed variability for enzyme activity and metabolism of carbon sources. Five isolated mulungu and jurema-preta and 6 isolates from angico were able to produce IAA in L-tryptophan supplemented medium, reaching rates above those achieved by the reference strain. As the potential of calcium phosphate solubilization for mulungu isolates, only one bacteria was able to achieve high solubilization equal to the reference strain, seven and two isolates from jurema-preta and angico, solubilized calcium phosphate above the reference strains value. For each species there bacteria were able to show tolerance to high temperatures and salinity. Isolates of angico and jurema were submitted to ARDRA using three endonucleases: MspI, HinfI and HhaI. The genetic diversity evaluation indicated that to angico a large cluster with around 40% of similarity was formed. To jurema-preta a major cluster with 65% of similarity among the isolates were achieved. In addition to high diversity of bacteria, patterns regarding its geographical occurrence were also observed. Bacteria from mulungu had the sequences of the 16S rRNA gene partially determined. Among the 13 bacteria with good sequences, six belong to *Rhizobium*, six *Bradyrhizobium* and one belongs to *Burkholderia*. The Efficiency of tests, 22 isolates of mimosa and 10 mulungu were able to renodulate their original host strains and A27 from Angico and M14 and M31 can be highlighted to mulungu.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation. Reforestation of degraded areas. Rhizobia.

## 1. INTRODUÇÃO

A Caatinga localizada em sua maior parte na região Nordeste do Brasil, compreende os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia, Piau, além do norte de Minas Gerais, ocupando 850.000 km<sup>2</sup> de extensão do território nacional (ALBUQUERQUE et al., 2012). É caracterizada por apresentar baixos índices pluviométricos, temperaturas elevadas e regime de chuvas distribuídas irregularmente no tempo e no espaço, proporcionando longos períodos de estiagem, como o que está ocorrendo nos últimos anos (QUEIROZ, 2009).

Os ecossistemas do bioma Caatinga encontram-se bastante alterados devido à atividade antrópica na substituição de espécies vegetais nativas por espécies cultivadas, pastagens e construções civis. As queimadas e o desmatamento são práticas muito comuns no preparo da terra para agropecuária, onde o sistema de agricultura itinerante utilizando a prática do corte e queima da vegetação nativa ainda é bastante empregado. Além de devastar a cobertura vegetal, essas ações prejudicam a manutenção das populações de fauna, flora e microbiota, influenciando negativamente na qualidade ambiental (ALVES et al., 2008, SOARES e ALMEIDA, 2011).

Dentre as espécies vegetais naturalmente ocorrentes no bioma Caatinga, plantas da família das leguminosas, (Fabaceae) possuem a maior diversidade e maior abundância dentre as angiospermas. Diversas destas leguminosas são utilizadas na agricultura (tanto em empreendimentos baseados na agricultura familiar como em sistemas intensivos de maior escala), em sistemas agrossilvipastoris e também na produção de insumos madeireiros, como lenha e

carvão, além de apresentarem aplicações medicinais e industriais. Do ponto de vista da recuperação ambiental, a utilização de insumos biológicos representa uma alternativa na redução dos efeitos deletérios gerados pela degradação. Estas espécies possuem a capacidade de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, através da formação de estruturas conhecidas por nódulos, onde ocorre o processo de transformação do N proveniente da atmosfera em uma molécula nitrogenada capaz de ser assimilável pelas plantas.

O nitrogênio é considerado o elemento mais abundante, compondo cerca de 80% da atmosfera terrestre. Paradoxalmente, é o macronutriente que comumente mais limita o crescimento e a produção vegetal nos trópicos. Isso porque as plantas não possuem mecanismos de absorção direta de nitrogênio ( $N_2$ ) disponível na atmosfera. Para a absorção do N pelos vegetais, este elemento necessita de ser fixado, ou seja, transformado em uma forma absorvível. Na natureza a principal fonte de nitrogênio assimilável pelos vegetais é a fixação biológica, realizada exclusivamente por um grupo de procariotos chamados coletivamente de diazotróficos. A incorporação do nitrogênio via fixação biológica nos diferentes ecossistemas do planeta, faz parte dos ciclos biogeoquímicos naturais. As bactérias fixadoras de nitrogênio possuem um complexo enzimático denominado nitrogenase capaz de transformar o  $N_2$ , em amônia ( $NH_3$ ), composto assimilável pelas plantas (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

O potencial das leguminosas da Caatinga para a utilização nos sistemas de recuperação de áreas degradadas é muito grande, devido, dentre outras características à sua capacidade de associação simbiótica de diversas espécies com bactérias fixadoras de nitrogênio do grupo dos rizóbios (LIMA et al., 2015). Para uma exploração adequada deste potencial, se faz necessário um constante trabalho de seleção de novos isolados rizobianos e a avaliação de sua eficiência em associação com os parceiros simbióticos.

Para testar a hipótese de que solos da Caatinga possuem uma alta diversidade de bactérias nodulíferas com potencial para fixação biológica do nitrogênio e promoção do crescimento em espécies de leguminosas nativas da Caatinga, o objetivo deste trabalho foi avaliar características fenotípicas, simbióticas e moleculares de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas nativas (Angico, Jurema-Preta e Mulungu) cultivadas em solos de áreas de Caatinga densa e Caatinga aberta do Agreste e do Sertão do Estado de Pernambuco.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a diversidade e a eficiência de bactérias nativas associadas a leguminosas arbóreas cultivadas em solos da Caatinga em diferentes áreas em Pernambuco.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a diversidade fenotípica e molecular de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas nativas cultivadas em solos do Estado de Pernambuco
- Avaliar a capacidade das bactérias nativas dos solos da Caatinga em fixar nitrogênio atmosférico associadas com Mulungu, Jurema-Preta e Angico.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 O bioma Caatinga

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, correspondente a 11% do território nacional e 54% do Nordeste brasileiro, abrangendo 850.00 km<sup>2</sup>, presente nos estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte, Sergipe, Piauí, Ceará, Alagoas e ainda no norte de Minas Gerais (ALVES et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2012).

O termo Caatinga vem de origem indígena Tupi, tendo por significado “mata clara ou branca” referente ao seu aspecto acinzentado e claro no período de estiagem (QUEIROZ, 2009). No entanto, existe uma separação entre o bioma e a vegetação de Caatinga. Como bioma, a Caatinga inclui pequenos encaves de outros tipos de vegetação, com vegetação aquática dos corpos de água e alagados, as matas serranas, os cerrados e os campos rupestres (SAMPAIO, 1995). A Caatinga como vegetação, tem sido considerada uma savana estépica, mas segundo Sampaio (1995) a diversidade de fitofisionomias no domínio das Caatingas dificulta o enquadramento em qualquer tipologia e sempre haverá áreas de exceção quanto à formação vegetacional. A vegetação *stricto sensu* da Caatinga pode ser conceituada como um tipo de floresta de porte baixo, apresentando grande variação fisionômica, florística e de aspectos morfofuncionais. Neste tipo de vegetação, destaca-se a família Fabaceae (Leguminosae) apresentando uma grande diversidade de hábitos, indo desde árvores de grande porte até ervas anuais ou perenes ou, ainda, trepadeiras (QUEIROZ, 2009).

A Caatinga é caracterizada ainda, pelas baixas e irregulares concentrações de chuvas que ocorrem em um período efêmero do ano. Devido a esta característica, muitas espécies vegetais

desenvolveram, estrategicamente, uma forma de adaptação a estas condições, tornando-se plantas caducifólias (QUEIROZ, 2011). Essas plantas caracterizam-se pela perda de folhas nos prolongados períodos de seca, reduzindo desta forma a perda de água por evapotranspiração, tendo suas folhas renovadas no período chuvoso.

Os solos da região por onde se estende a Caatinga têm uma distribuição espacial complexa, formando um mosaico com diferentes tipos, que vão desde solos rasos e pedregosos podendo ser classificados como Neossolos Litólicos, Cambissolos, etc., aos solos profundos e fisicamente bem estruturados, como os Latossolos e Argissolos. Os solos rasos, ricos em minerais, pobres em matéria orgânica e com baixa capacidade de armazenamento da água são os mais comuns e apresentam ampla distribuição na região (CUNHA et al., 2011). Os diferentes mosaicos de solos encontrados nas áreas que abrangem a Caatinga resultam em uma comunidade vegetal diversificada por meio da presença de espécies vegetais adaptadas aos solos que apresentam características distintas (LEAL et al., 2005).

As leguminosas arbóreas, presentes nesses ambientes, apresentam grande importância econômica, muitas espécies são típicas de vegetação aberta facilitando sua adaptação no reflorestamento de áreas antropizadas. Outras são espécies adaptadas a áreas de Caatinga densa, que predominam em etapas mais avançadas da sucessão ecológica. As leguminosas são espécies potencialmente capazes de promover simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, importantes nos ciclos biogeoquímicos nos agroecossistemas, agindo na transformação do  $N_2$  atmosférico em compostos nitrogenados assimiláveis pelos vegetais. Essa associação pode tornar a planta parcialmente ou totalmente independente de outras fontes de N (NOGUEIRA et al., 2012), proporcionando a exequibilidade de um manejo sustentável, beneficiando as esferas sociais, econômicas e ecológicas da região semiárida.

Apesar de apresentar uma cobertura vegetal diversificada, resultando em sistemas ecológicos variados e ser um ambiente de alta diversidade e grau de endemia (LORENZI, 2008), a Caatinga tem sido pouco assistida pelos órgãos de preservação ambiental. Esse bioma apresenta um grau alarmante de antropização e, assim como ocorre em outras regiões tropicais, os sistemas de produção agrícola predominantes nessas áreas são voltados à conversão de áreas de vegetação nativas em áreas de cultivo e pastoreio, envolvendo cortes e queimas da vegetação, findando no abandono destas áreas (SAMPAIO, 1995). O uso intensivo das florestas para produção de lenha, uso agrícola e pecuária, são as principais causas de desmatamento, que atinge aproximadamente 46% das áreas nativas. Essas ações têm como consequência uma infinidade de pequenas áreas

abandonadas para regeneração espontânea, intercaladas a poucas áreas preservadas (SAMPAIO, 1995), resultando em grande perda de biodiversidade nesses ambientes.

Pela exploração das atividades econômicas, principalmente a agropecuária, ao longo dos anos sem o manejo adequado do bioma, atualmente há um comprometimento de mais de 60% da área da região semiárida com algum estágio de desertificação (ANGELOTTI et al., 2013). Atualmente, o Código Florestal Brasileiro prevê proteção legal para apenas 20% das áreas dentro dos limites do bioma (BRASIL, 2012 Lei, 12651/2012). Além deste percentual, há a necessidade urgente da readequação dos sistemas produtivos na região, além de ações efetivas de recuperação ambiental.

### **3.1.1 Leguminosas arbóreas da Caatinga, Família Fabaceae (Leguminosae)**

A família Fabaceae (Leguminosae) é uma das mais abundantes no que se refere à quantidade de espécies já descritas. No território brasileiro essa família possui uma diversidade de 2802 espécies e 221 gêneros, sendo 525 espécies descritas por domínio filogenéticos no bioma Caatinga (LIMA et al., 2014). Sua classificação reconhece três subfamílias: Mimosoideae, Faboideae (Papilionoideae) e Caesalpinioideae (KAUR et al., 2013).

Dentre as leguminosas arbóreas da Caatinga, inúmeras são indicadas para recuperação de áreas degradadas. Leguminosas nativas, adaptadas às condições de Caatinga (altas temperaturas e baixa disponibilidade de água), podem ser capazes de crescer e, potencialmente, produzir insumos biológicos com vantagem sobre outras espécies. No presente estudo três espécies de importâncias econômica e ambiental foram escolhidas: *Mimosa teanuiflora* Poir, *Anadenanthera colubrina* Vellozo, *Erythrina velutina* Willd.

A jurema-preta (*Mimosa teanuiflora*) é uma espécie arbórea com cerca de 5 a 7 m de altura pertence à subfamília Mimosoideae, sua casca apresenta a cor castanho-escura, grossa, rugosa, fendida longitudinalmente. Com ramificação abundante possui folhas divididas, com 15 a 33 pares de folíolos brilhantes e espinhos. Possui inflorescência em espigas com flores brancas, muito pequenas. O fruto é uma vagem pequena (2,5 a 5 cm de comprimento), as sementes são pequenas, ovais, achatadas e de cor castanho-clara. Ocorrendo no Semiárido de todos os estados do Nordeste (CAMPANHA, 2010).



A jurema-preta é uma árvore pioneira e abundante em áreas degradadas da Caatinga, ocorrendo em todos os tipos de solo. Suas raízes têm alta capacidade de penetração em terrenos compactos, o que facilita a utilização na restauração florestal de áreas degradadas. Em áreas menos degradadas pode ser utilizada em manejo sustentável, para produção de madeira, lenha e carvão (CAMPANHA, 2010).

O Angico (*Anadenanthera colubrina*) pertence à subfamília Mimosoideae, é uma árvore que pode apresentar o hábito perenifólio ou semicaducifólio. Apresenta de 10 a 20 m podendo atingir até 35 m de altura na idade adulta. Sua casca externa apresenta coloração branca-acinzentada a cinza-escura, áspera e provida de fendas finas longitudinais e a casca interna é levemente avermelhada. As folhas são compostas bipínadas, paripinadas; raque da folha com 15 a 20 cm de comprimento, com 15 a 35 pares de pinas multifoliolados, o pecíolo possui de 3 a 5 cm de comprimento. Suas flores são brancas, pequenas, perfumadas, reunidas em inflorescências terminais, em panículas de glomérulos com até 40 cm de comprimento. O fruto é um folículo achatado, deiscente, coriáceo, castanho avermelhado, com superfície rugosa e dotada de pequenas excrescências, com 15 cm a 32 cm de comprimento por 2 cm a 3 cm de largura. Cada fruto contém 8 a 15 sementes. A semente é castanha a pardo-avermelhada escura, brilhante, lisa, comprimida ou achatada, pequena com 2 cm de comprimento e 1,5 cm de largura. Ocorre em outras partes do Brasil, não sendo exclusiva da região da Caatinga (CARVALHO, 2002).

A madeira do angico é utilizada para produção de energia, cedendo lenha e carvão de boa qualidade, é indicada para a marcenaria, obras internas, ripas, implementos, construção civil e naval. Além de ser útil para fins medicinais, alimentação animal e paisagismo, o angico é utilizado também no reflorestamento de áreas degradadas (CARVALHO, 2002).

Pertencente à subfamília Faboideae (Papilionoideae), o mulungu (*Erythrina velutina*) é uma árvore de porte arbóreo, com alturas próximas a 15 m na idade adulta. Possui uma casca que mede até 0,25 cm de espessura, lisa a levemente áspera. Suas folhas são compostas trifoliadas, sustentadas por pecíolo de 6 cm a 14 cm de comprimento, os folíolos são orbiculares, oval-rômbeos ou triangulares, de consistência cartácea, com a face ventral apenas pulverulenta e dorsal, de cor verde mais clara medindo de 6 cm a 12 cm de comprimento por 5 cm a 14 cm de largura. Nas flores o vexilo é alaranjado ou vermelho intenso, com lâmina quase orbicular e cálice espatáceo. O fruto é um legume um tanto curvo, de ápices e bases agudas, internamente não-septado, com 1 a 3 sementes, suas sementes são bicolors denominadas miméticas, de coloração vermelho-escura e vermelho-alaranjada, com um hilo curto de posição mediana (CARVALHO, 2008).

Ocorre em todo Nordeste Brasileiro e em Minas Gerais, englobando os biomas Caatinga, Mata Atlântica e o Cerrado. O mulungu possui diversas utilidades, como por exemplo, alimentação, artesanato, produção de carvão, medicina popular, produção de corantes, paisagismo e também reflorestamento de áreas degradadas (CARVALHO, 2008).

A utilização de leguminosas torna-se ainda mais relevantes no sistema agroambiental graças a sua associação com bactérias fixadoras de nitrogênio que formam estruturas especializadas, em sua maioria nas raízes das plantas, denominadas nódulos. Devido a capacidade de simbiose leguminosa-rizóbio, estas plantas podem colonizar ambientes empobrecidos em nitrogênio, minimizando impactos ambientais e aumentando a qualidade do solo.

### **3.2. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)**

Apesar do nitrogênio representar cerca de 80% da composição gasosa da atmosfera, o  $N_2$  não está disponível para absorção direta pelas plantas. Dessa forma, os vegetais dependem do fornecimento de formas nitrogenadas absorvíveis, que pode ocorrer por natureza química e/ou física na atmosfera, por meio da ação antrópica na produção de fertilizantes nitrogenados ou por ação biológica de um conjunto de procariotos denominados diazotróficos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; BOYD e PETERS, 2013).

Estima-se que o nitrogênio liberado anualmente na atmosfera através de agentes não biológicos contribua com cerca de 10% das formas assimiláveis disponibilizada aos vegetais. A produção industrial com 25% e o processo biológico com 65%, com estimativa de 33 a 46 toneladas de nitrogênio fixado biologicamente ao ano, indicando a grande relevância da FBN para o fornecimento de N em formas assimiláveis pelos vegetais e, conseqüente, entrada de N nas cadeias alimentares. (HUNGRIA et al., 2001; HERRIDGE et al., 2008).

Micro-organismos diazotróficos apresentam uma grande diversidade cultural, fisiológica, genética e filogenética, podendo ser classificados dentro dos domínios Bacteria e Archea, com hábitos de vida aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos, sendo ainda de vida livre, associativos ou simbióticos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SANTI et al., 2013; GUIMARÃES et al, 2015).

A FBN ocorre por meio da catálise que o complexo enzimático nitrogenase realiza. Para estas enzimas, a forma mais abundante é que contem dois componentes, uma ferro-proteína, que se

liga a ATP e atua como doador de elétrons, chamada de dinitrogenase redutase, e por uma ferro-molibdênio, proteína que contém o sítio de redução do substrato, a dinitrogenase (HOWARD et al., 2013). Estudos realizados com *Azotobacter vinelandii* e *Rhodobacter capsulatus* submetidas a condições de baixos teores de molibdênio, induziram a síntese de nitrogenases alternativas formadas por vanádio-ferro ou cofatores ferro-ferro (EADY, 1996). Atualmente sabe-se que as nitrogenases baseadas em vanádio proteínas e em ferro proteínas são muito abundantes na natureza, entretanto sua diversidade e eficiência são pouco estudadas (GABY et al., 2014). A fixação do N por via biológica na superfície terrestre, principalmente nos agroecossistemas, ocorre a uma temperatura ambiente e pressão em torno de 1 atm, onde será utilizada energia provenientes dos processos foto e quimiossintéticos, ocorrendo, portanto, em condições fisiológicas de normais para a maioria dos seres vivos, ou obtida pelo processo industrial de Haber-Bosch, onde o N<sub>2</sub> é reduzido a amônio. Para a transformação do N<sub>2</sub> em amônia (NH<sub>3</sub>) através do processo industrial são necessárias temperaturas elevadas (300 °C), queima de combustíveis fósseis, catalizador contendo ferro e altas pressões (200 a 800 atm), resultando no gasto estimado de seis barris de petróleo para cada tonelada de NH<sub>3</sub> produzido, gerando assim grandes impactos poluentes na atmosfera (HUNGRIA et al., 2001; SANTOS et al., 2008; OLDROYD e DIXON, 2014). Devido ao elevado custo de produção, os fertilizantes nitrogenados são também bastante onerosos, o que representa uma desvantagem para o seu uso elevando assim os seus custos ao consumidor final, os produtores rurais. Assim, a maximização da FBN nos agroecossistemas é uma alternativa ambiental e economicamente atrativa por reduzir os impactos ambientais e os custos de produção.

Dentre as bactérias diazotróficas, aquelas que se associam a espécies vegetais têm especial importância na utilização pelo homem, principalmente na agricultura. Estudos com bactérias capazes de se associar com plantas não-leguminosas já foram conduzidos para espécies vegetais das famílias Euphorbiaceae, como a mandioca (macaxeira) (FERNANDES et al., 2003), Myrtaceae como o eucalipto (SILVA et al., 2015), Asteraceae, como o girassol (AMBROSINI et al., 2016), Arecaceae, como o dendê (CARVALHO et al., 2003), Bromeliaceae, como o abacaxi (WEBER et al., 2014) e bromélias nativas (GIONGO et al., 2015), dentre outras famílias botânicas. Estes estudos, geralmente apontam para, junto a outros aspectos, a ocorrência de isolados bacterianos com o potencial de utilização para a inoculação das espécies hospedeiras.

Entretanto, com relação às não-leguminosas, as gramíneas (Poaceae) se destacam com o volume de conhecimento acumulado e com o avanço tecnológico já alcançado. Diversos estudos com gramíneas de importância econômica como o milho (HUNGRIA et al., 2010; ALVES et al., 2014; BREDA et al., 2016), cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2009), arroz

(BALDANI et al., 1986; PEREIRA et al., 2016), trigo (HUNGRIA et al., 2010), dentre outras gramíneas, têm indicado a presença de isolados com capacidade de promover o crescimento vegetal e fixar N em quantidades significativas condições de campo. Tanto que no Brasil este avanço tecnológico já resultou na autorização por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de um inoculante contendo estirpes de *Azospirillum brasilense* para as culturas do milho, trigo e arroz (BRASIL, 2011).

Entretanto, a parceria mais bem estudada na associação entre macro e microssimbionte é a associação entre representantes da família das leguminosas e bactérias do grupo dos rizóbios. Assim como as gramíneas, há grande quantidade de leguminosas de importância agropecuária, por esse motivo estudos com leguminosas têm visado, ao longo dos anos selecionar rizóbios para culturas de interesse agrícola como a soja (FREIRE e VERNETTI, 1999), o feijão-comum (MOSTASSO et al., 2000), o feijão-caupi (MARTINS et al., 2003), o amendoim (SANTOS et al., 2007), dentre outras culturas. A seleção de rizóbios para as culturas de interesse agrícola ao longo dos anos culminou com uma listagem de 151 estirpes de rizóbios recomendados para aproximadamente 80 espécies de leguminosas (BRASIL, 2011).

A simbiose entre as bactérias diazotróficas e as leguminosas é a mais aceita no cenário mundial como uma alternativa à fertilização química em culturas agrícolas (FREITAS et al., 2014). O maior exemplo de sucesso da FBN nos sistemas agrícolas em todo o mundo é o da soja brasileira, cujos estudos de melhoramento genético e adaptação de cultivares que tiveram início nos anos 1950, já avaliavam a resposta das plantas à inoculação com estirpes de rizóbio e a paralela seleção de estirpes nativas (FREIRE e VERNETTI, 1999). Assim, os materiais genéticos de soja hoje disseminados no Brasil são altamente responsivos à inoculação com rizóbio, dispensando completamente a utilização de fertilizantes nitrogenados, culminando com uma economia estimada de 6,6 bilhões de reais para a balança comercial brasileira (HUNGRIA et al., 2006).

Na região Nordeste, mais especificamente na região Semiárida, os estudos de seleção de estirpes de rizóbio foram conduzidos ao longo dos últimos 13 anos, principalmente na prospecção de bactérias de feijão-caupi. Os resultados de pesquisa indicaram a presença de uma comunidade muito diversa com representantes de gêneros como *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* (LEITE et al., 2009) e *Ensifer* (BARDEN, 2014) e *Microvirga* sendo este último representado pela espécie recém descrita *M. vignae* oriunda de solo da bacia do Rio São Francisco em Sergipe (RADL et al., 2014). Além de diversa, estudos avaliando a eficiência em condições de campo têm indicado que os solos da região semiárida são uma fonte importante de micro-organismos com potencial biotecnológico

para a inoculação do feijão-caupi (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012a; MARTINS et al., 2013; MARINHO et al., 2014).

Nos últimos dez anos, os trabalhos que visaram avaliar a eficiência e a diversidade de comunidades rizobianas em espécies nativas da Caatinga tiveram início com o trabalho pioneiro de Teixeira et al. (2006) que avaliaram as taxas de FBN em camaratuba (*Cratylia mollis*) utilizando a técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  e determinaram que esta espécie pode ter mais de 80% do N em seus tecidos foliares derivado do ar e incorporado via FBN. Desde então, estudos de eficiência de comunidades rizobianas têm sido conduzidos e padrões variáveis de taxas de FBN têm sido encontrado em diferentes áreas de Caatinga, a depender da região, precipitação local, do estágio sucessional, dentre outros fatores (FREITAS et al., 2010; 2012 e 2014). Além da eficiência, estudos de diversidade de rizóbios nodulantes de espécies nativas têm sido conduzidos e a ocorrência de uma grande diversidade de bactérias tem sido determinada (TEIXEIRA et al., 2010; REIS JÚNIOR et al., 2010; MARTINS et al., 2015; MENEZES et al., 2016).

O estudo da diversidade fenotípica e genética busca compreender as relações ecológicas e evolutivas de cada estirpe microbiana, visando encontrar estirpes eficientes na tolerância de diversos fatores, sejam eles bióticos ou abióticos (RUMJANEK et al., 2005). Esta diversidade pode ser avaliada através de características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e genéticas (MOREIRA, 2008).

Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias que avaliam a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio e o potencial destas na promoção de crescimento vegetal em espécies arbóreas nativas são de grande relevância pois podem culminar em bactérias ou técnicas que proporcionem o desenvolvimento de plantas mais saudáveis e que se adaptem de forma mais eficiente as diversas condições de solo e clima das regiões semiáridas. Sendo, portanto, o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio uma alternativa tanto para o período de produção de mudas, quanto na adaptação dessas plantas às condições de campo.

### **3.3 Caracterização fenotípica de bactérias que nodulam leguminosas**

A caracterização cultural dos isolados rizobianos geralmente é a primeira etapa do processo de obtenção dos isolados e avaliação de sua biodiversidade. Nesta etapa as características das bactérias no meio de cultura, geralmente o meio YMA (VINCENT, 1970), são avaliadas e informações relativas ao tempo de crescimento dos isolados, alteração do pH do meio, produção de

muco, cores e aspectos das colônias, dentre outros são obtidos (MARTINS et al., 1997). Estas informações são importantes e permitem a seleção preliminar de isolados, separando-os em grupos de gêneros, por exemplo. Com relação ao tempo de crescimento, os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Allorhizobium* e *Burkholderia* apresentam crescimento rápido, já *Mesorhizobium* crescimento intermediário, enquanto *Bradyrhizobium* apresentam crescimento lento. Esses são exemplos de características gerais para os gêneros, podendo variar de acordo com a estirpe. De posse destas informações, é possível realizar a triagem inicial dos isolados, e a separação destes em grupos de micro-organismos para avaliações futuras.

Além das características culturais, outras características fenotípicas podem trazer informações importantes sobre o perfil metabólico das coleções rizobianas e do seu potencial para a promoção do crescimento vegetal. Assim, avaliações de tolerância a estresses abióticos “in vitro” como aumento das concentrações de sais no meio de cultura, tolerância a diferentes temperaturas de incubação, por exemplo, podem indicar a variabilidade fenotípica das coleções, bem como apontar para a capacidade destes micro-organismos em tolerar condições de estresses abióticos no campo (INDRASUMUNAR et al., 2011; FERNANDES JÚNIOR et al., 2012b).

A salinidade e a temperatura do solo são uns dos principais fatores que limitam a fixação simbiótica do nitrogênio. Estudos apontam que o estresse salino reduz significativamente a fixação de nitrogênio, conseqüentemente a nodulação em leguminosas, interrompendo a ciclagem de nutrientes essenciais para sobrevivências das plantas (KUCUK et al., 2006; ST.CLAIR e LYNCH, 2010; SHETTA et al., 2011). A seleção e caracterização de estirpes rizobianas tolerantes a salinidade representam uma potencial estratégia para melhoria da FBN nestas condições constituindo uma alternativa econômica e sustentável à fertilização química (REJILI et al., 2012)

Tal como a salinidade, a temperatura é um dos fatores mais importantes que afeta o crescimento e desenvolvimento da planta. Considerando os impactos causados pelo aquecimento global, muitas instituições de pesquisas vem intensificado seus trabalhos nesta área, onde segundo o relatório do IPCC (2013) sugere um aumento de temperatura média anual de 4 °C até o final do século. Levando em consideração tal informação, deve-se considerar o efeito do aumento da temperatura sobre a interação planta-micro-organismo, uma vez que, o efeito das mudanças climáticas gera uma alternância na dinâmica populacional e na fenologia das plantas (MENZEL e FABIAN 1999; CHMIELEWSKI et al., 2004; BÉLANGER et al., 2005).

Altas temperaturas podem afetar direta ou indiretamente a FBN. Os efeitos indiretos são normalmente relatados por meio da redução na sobrevivência bacteriana no solo (MICHELIS et al.,

1994) e diretamente através da alteração na função de algumas proteínas do ciclo da FBN e/ou os ciclos relacionados (HUNGRIA e KASCHUK 2014). Estudos em espécie de *Macropitium atropurpureum* (siratiro) realizados por Angus et al., (2013), demonstraram que *B. tuberum* inoculadas em placas durante as fases iniciais de crescimento, tanto nas fases lag como log, exibiram um crescimento limitado a 30° C e nenhum crescimento a temperaturas mais elevadas (até 40° C), mas, para *R. tropici* com as mesmas etapas de crescimento houve um aumento tanto a 37 quanto a 40° C, confirmando a tolerância desta espécie a temperaturas elevadas.

Destacam-se também como características fenotípicas, bactérias capazes de utilizar diversas fontes de carbono revelando o seu potencial na mobilização deste elemento em moléculas distintas em sua natureza química. Em sua maioria são utilizados kits comerciais, como o API 20 NE, por exemplo, ou testes convencionais, por exemplo com a substituição do Manitol por diferentes fontes de carbono no meio de cultura YMA.

Testes bioquímicos como a estimativa na produção do ácido Indol-acético (AIA), e na capacidade de solubilizar Fosfato de Cálcio, associados à FBN, podem indicar estirpes que possam trazer uma melhor desenvoltura na promoção de crescimento vegetal.

Os fitohormônios são biomoléculas importantes, produzidas pelas plantas com a finalidade de sua manutenção e desenvolvimento celular (GALVÃO et al., 2010; TAIZ e SEIGER, 2013). O AIA é considerado o mais comum e o melhor caracterizado, suas alterações na região radicular maximizam a absorção de nutrientes e as interações benéficas entre plantas e micro-organismos (BOIERO et al., 2007; HAYAT et al., 2010). Este hormônio, além de ser produzido pelas plantas também podem ser produzidos por algumas bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico, como já foi comprovado com estirpes de *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Grimontella*, *Pantoea*, *Rahnella* entre outros gêneros (TSAVKELOVA et al., 2006; RAMÍREZ e KLOEPPER 2010; COSTA et al., 2014).

O fósforo (P) é um macronutriente, considerado essencial para planta, pois participa como composto estrutural de ácidos nucléicos, fosfolipídios e da adenosina trifosfato (ATP), componente principal no funcionamento do metabolismo celular (SOUZA et al., 2015). Bactérias com capacidade de solubilizar fosfatos quando utilizadas como inoculantes, representam uma alternativa interessante, uma vez que, parte do fósforo encontrado no solo está na forma orgânica, indisponível para plantas (YADAV et al., 2014). Estas bactérias adquirem P do solo por meio de vários mecanismos e tem a capacidade de estimular processos metabólicos que são efetivos na sua

solubilização e mineralização (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Em solos com baixos teores desse mineral, bactérias fixadoras, além de fixar o nitrogênio transformando-o em forma assimilável para plantas, também podem auxiliar na captura de outros nutrientes, gerando assim um inoculante potencial no desenvolvimento e na promoção de crescimento na planta.

### **3.4 Caracterização genotípica de bactérias que nodulam leguminosas**

Os avanços nas técnicas de biologia molecular ao longo dos últimos 20 anos resultaram no desenvolvimento de ferramentas potentes para os estudos relacionados à diversidade genética e taxonomia microbiana. Atualmente estas técnicas são muito relevantes para os estudos de diversidade rizobiana pois permitem a avaliação de um grande número de isolados em um curto espaço de tempo, gerando informações precisas e com elevada acurácia. Além disso, a redução dos custos dos equipamentos, materiais de consumo e serviços têm ocorrido nos últimos anos, colaborando para a popularização das técnicas e por aumento do número de laboratórios com capacidade para gerar tais informações.

Dentre as técnicas utilizadas para a avaliação da diversidade rizobiana, aquelas baseadas nas reações de PCR (polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase) merecem destaque pelo seu amplo uso. A PCR, descrita por Kary Mullis (1983) tem permitido grandes avanços na taxonomia e diversidade genética dos rizóbios. Com a finalidade de amplificar fragmentos específicos do genoma de interesse, utilizando iniciadores complementares às sequências localizadas nos flancos de regiões específicas do genoma, a PCR permite a obtenção de uma grande quantidade de cópias de um gene, ou uma região, de interesse, permitindo além de detecção de sua presença, a utilização deste produto em análises complementares. Variações da PCR permitem ainda a amplificação de fragmentos com tamanhos variáveis, e não apenas um amplicom, como a PCR original. Um exemplo desta abordagem é a da técnica de Box-PCR desenvolvida por Versalovic et al. (1994), cujos perfis gerados na reação de amplificação são avaliados em géis de agarose e permitem a comparação de um grande número de estirpes de rizóbio (STOCCO et al., 2008, TORRES-JÚNIOR et al., 2014). O ARDRA, técnica descrita por Laguerre et al. (1994), é considerado uma técnica muito utilizada para formação de dendrogramas de similaridade, onde consiste na amplificação do 16s rRNA e sua posterior digestão com enzimas de restrição. Tal técnica baseia-se no princípio que os sítios de restrição do rRNA são conservados de acordo com padrões filogenéticos, sendo assim, uma ferramenta importante na seleção dos isolados



para prosseguir com testes de alto custo, evitando assim o desperdício de tempo e/ou dinheiro com possíveis isolados sem potencial.

A amplificação de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*, através do PCR, indicam a presença da FBN, sendo uma alternativa na dispensa de trabalhos laboriosos utilizados para sua comprovação. A amplificação individual dos genes *nifH* e *nodC*, proposto a princípio por Mothapo et al., (2013), visando uma prévia avaliação da capacidade diazotrófica e nodulifera de isolados de nódulos de leguminosas, requer um período maior de tempo e com isso gastos econômicos desnecessários. Com isso, Fernandes Júnior et al., (2013), desenvolveram um protocolo cujo princípio foi à amplificação destes mesmos fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*, otimizando tempo e reação. Estudos visando à taxonomia de bactérias simbióticas estão em constante mudança impulsionados, principalmente, pelos avanços dos estudos moleculares. Avanços nos estudos do sequenciamento do gene 16S rRNA, região de alta conservação nas bactérias de maneira geral (WOESE et al., 1991), geraram uma obrigatoriedade na descrição de espécies bacterianas, fazendo com que o critério antes considerado primordial, a nodulação em leguminosas, se tornasse um critério secundário (RIVAS et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2015).

Graças aos estudos baseados em sequências de marcadores moleculares, houve um avanço significativo nos estudos taxonômicos de bactérias rizobianas. Desde então os rizóbios foram incluídos no filo Proteobactéria e a sequência completa do gene 16S rRNA foi obtida em todas as espécies rizobianas classificadas em diferentes gêneros e famílias dentro deste filo (PEIX et al., 2015; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2015). Até 2001, todas as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas eram enquadradas na subclasse  $\alpha$ -proteobacteria, classificadas nos gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (*Enfiser*), *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* e mais recentemente *Aminobacter* e *Microvirga* (GYANESHWAR et al., 2011).

Com o sequenciamento do gene 16S rRNA houve ainda a identificação de outras bactérias em nódulos de leguminosas, tais como *Burkholderia*, sendo a primeira  $\beta$ -Proteobacteria descrita como simbiote de leguminosa, através de estudos realizados por Moulin et al (2001) isolando duas estirpes (STM678 e STM815) de *Aspalathus carnosa* (Papilionoideae) na África do Sul e *Machaerium lunatum* (Papilionoideae) na Guiana Francesa, respectivamente, posteriormente foram nomeadas por *Burkholderia tuberum* e *Burkholderia phymatum* (VANDAMME et al., 2002).

A maioria das espécies de leguminosas é conhecida por nodular com  $\alpha$ -proteobacteria, enquanto as  $\beta$ -proteobacteria nodulam preferencialmente com membros da subfamília *Mimosoidae*,

como os gêneros *Mimosa* e *Piptadenia*, por exemplo (GARAU et al., 2009; REIS JÚNIOR et al., 2010; TAULÉ et al., 2012; HOWIESON et al., 2013; MARTINS et al., 2015) mas também nodulam com alguns membros da subfamília *Papilionoidae* (ELLIOTT et al., 2007; ANGUS et al., 2013; da SILVA et al., 2012; BOURNAUD et al., 2013). Segundo Melkonian, et. al (2014) os  $\beta$ -proteobacteria confirmadamente nodulantes descritas até presente estudo pertencem a dois gêneros (*Burkholderia* e *Cupriavidus*), apresentando elevada diversidade, principalmente com relação aos simbiossitos de *Mimosa* sp. em várias áreas geográficas.

A nodulação preferencial das Mimosoidae por *Burkholderia* sp. era considerada um consenso e levantava poucos questionamentos na comunidade científica. Porém muito recentemente Bontemps et al. (2016) demonstraram que para um grupos de espécies do gênero *Mimosa* endêmicas do México, a nodulação é preferencial com as  $\alpha$  em detrimento às  $\beta$ -proteobacterias. Estes resultados indicam que apesar da quantidade de resultados levantada para a taxonomia de bactérias nodulantes de leguminosas, principalmente nos últimos anos, novos resultados de pesquisa podem também trazer contribuições importantes, o que ressalta a necessidade de constantes levantamentos da diversidade rizobiana, principalmente associadas às espécies nativas.

Baseando-se em tais princípios, conhecer as características fenotípicas e genotípicas de estirpes provenientes de diferentes solos da Caatinga, potencializam sua utilização em manejos sustentáveis de uma forma ecologicamente natural, auxiliando em sua adaptação e desenvolvimento, além de colaborar para o avanço no conhecimento da diversidade rizobiana e da ecologia do solo da região de Caatinga.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do experimento e obtenção dos isolados

Os experimentos foram executados no Laboratório de Microbiologia do Solo e em casa de vegetação na Embrapa Semiárido no município de Petrolina, PE. As bactérias foram previamente isoladas por Silva (2015) e estão depositadas na Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA) em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estas bactérias foram obtidas de solos provenientes de áreas de Caatinga densa e Caatinga aberta (em processo de regeneração) dos municípios de Caruaru, Garanhuns, Serra Talhada e Petrolina. Para o isolamento das bactérias foram utilizadas três leguminosas nativas da Caatinga (*Mimosa tenuiflora* Poir, *Anadenanthera colubrina* Vellozo e *Erythrina velutina* Willd.) em experimentos de vasos como plantas-isca. No total foram isoladas trezentas e oito bactérias dos nódulos das leguminosas, sendo, noventa e sete isolados do mulungu, oitenta e dois do angico e cento e vinte nove da jurema-preta.

### 4.2 Caracterização genotípica dos isolados

Todas as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YMA para a avaliação de sua pureza. As colônias puras foram crescidas em meio líquido para a extração do DNA conforme descrito a seguir.

Para a caracterização genotípica das bactérias os isolados foram submetidos a uma reação de duplex PCR como ferramenta para a seleção de isolados detentores dos genes simbióticos *nodC* e

*nifH*. Os isolados selecionados nesta etapa foram avaliados quanto à sua variabilidade genética por meio da técnica de Análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) utilizando três endonucleases.

Para os isolados selecionados do mulungu, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado. Para tal, o gene foi amplificado, purificado com kit comercial e enviado para a empresa Macrogen em Seul, Coreia do Sul.

#### **4.2.1 Seleção dos isolados por meio da amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC***

Todos os 308 isolados foram analisados quanto à amplificações de fragmentos dos genes simbióticos *nifH* e *nodC* foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Fernandes Júnior et al. (2013) utilizando os iniciadores PolF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PolR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) para amplificação de um fragmento do gene *nifH* em torno de 360 pb (POLY et al., 2001), e NodCF (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) e NodCR(I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) para amplificação de um fragmento do gene *nodC* com em torno de 980 pb (LAGUERRE et al., 2001). As reações foram dimensionadas para um volume final de 10 µL contendo, tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 µM, dNTP 1,2 µM, Taq DNA polimerase 0,25 U e 1 e 0,6 µM dos iniciadores do gene *nifH* e *nodC*, respectivamente. A amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1min e extensão final 72°C por 1 min.

Os isolados das espécies jurema-preta e angico que não apresentaram amplificação positiva para o gene *nodC* na reação de duplex-PCR, mas amplificaram o gene *nifH* foram submetidos à amplificação de fragmentos do gene *nodC* utilizando os iniciadores nodCForBurk (CTCAATGTACACARNGCRTA) e nodCRevBurk (GAYATGGARTAYTGGYT), descritos por Elliott et al. (2007) e desenhados para a amplificação em β-rizóbios, principalmente os do gênero *Burkholderia*. As reações foram dimensionadas para um volume final de 10 µL contendo, tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,7 µM, dNTP 0,8 µM, Taq DNA polimerase 0,2 U e 0,75 µM dos iniciadores. A reação foi conduzida em um termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems, EUA), consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final 72°C por 1 min.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 120 V por 80 minutos, as amostras foram coradas com GelRed (Biotium) 0,5X. A visualização do gel se deu através de um transluminador com luz UV.

A partir da seleção dos isolados positivos para amplificação de ao menos um dos genes simbióticos (*nifH* e/ou *nodC*) deu-se a continuação dos testes genotípicos e fenotípicos, tolerância a altas concentrações de salinidade e temperatura, solubilização de fosfato, produção de AIA, utilização de diferentes fontes de carbono e por fim, depois da coleta de dados provenientes dos testes anteriores, um ensaio de avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de angico e mulungu em casa vegetação com substrato estéril foi realizado.

#### **4.2.2 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) das bactérias isoladas do angico e da jurema-preta**

Para os 40 isolados de jurema-preta e 44 de angico selecionados nas reações de Duplex-PCR, foi realizada a avaliação da diversidade genética por meio da técnica de ARDRA. Para tal, o gene 16S rRNA foi amplificado empregando os iniciadores universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (WEISBURG et al., 1991). Para a amplificação, o volume final foi ajustado para 30  $\mu\text{L}$  contendo 1X reaction buffer, 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0,25  $\text{mmol L}^{-1}$  de cada dNTP, 1 U of Taq DNA polimerase e 0,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada iniciador. A reação foi conduzida em um termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems, EUA) com uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94° C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 60° C por 45 s e de extensão a 72 °C por 2 min, seguido de uma etapa final de extensão a 72° C por 5 min.

O produto da amplificação foi submetido a eletroforese horizontal em gel de agarose visualizado em fotodocumentador com luz UV conforme descrito anteriormente. As reações de restrição foram realizadas utilizando as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *HinfI*, conforme as orientações do fabricante. As reações ocorreram durante 12 horas a 37° C e os produtos de digestão foi submetido a eletroforese horizontal em gel de agarose a 3% em tampão TAE 1% por 3 horas a voltagem constante de 100 V. Para a estimativa dos tamanhos moleculares dos fragmentos, utilizou-se nas laterais dos géis os marcadores de peso molecular 100 bp (Invitrogen). As amostras foram coradas com GelRed 0,5X e visualizadas em fotodocumentador com luz UV. As imagens dos géis foram analisadas com o auxílio do programa BioNumerics 7.0 (Applied Maths, Bélgica), utilizando

o coeficiente de Jaccard. O método de agrupamento UPGMA foi utilizado para a construção dos dendrogramas de similaridade.

### **4.2.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análises filogenéticas das bactérias isoladas do mulungu**

Todas as bactérias isoladas do mulungu tiveram o gene 16S rRNA amplificado e sequenciado para a determinação do seu posicionamento taxonômico. O gene 16S rRNA foi amplificado conforme descrito anteriormente e purificado utilizando o kit comercial “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, EUA). Os produtos de PCR amplificados foram enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen, em Seul, Coréia do Sul. O sequenciamento foi realizado na plataforma ABI 3037 xl (Applied Biosystems, EUA) utilizando o iniciador 27F, seguindo os protocolos da empresa prestadora do serviço.

A qualidade das sequências recebidas foi verificada utilizando o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems). Sequências de boa qualidade com comprimento não inferior a 1000 pb foram utilizadas para a comparação com aquelas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) (ALTSCHUL et al., 1990) utilizando o algoritmo BLASTn. As sequências mais similares, assim como as sequências de estirpes tipo (type strains) foram baixadas para o alinhamento e construção das árvores filogenéticas.

O alinhamento foi feito utilizando o algoritmo CrustalW e as árvores construídas utilizando o método de agrupamento Neighbour-Joining com o algoritmo de Jukes-Cantor com o auxílio do programa Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013).

## **4.3 Caracterização fenotípica**

### **4.3.1 Tolerância à salinidade no meio de cultura e incubação em diferentes temperaturas**

As 102 bactérias foram avaliadas quanto à tolerância à salinidade por meio da adição de diferentes concentrações de NaCl no meio de cultura sólido e tolerância a diferentes faixas de temperatura por meio da avaliação do crescimento em meio sólido após incubação.

Para o teste de tolerância à salinidade, os isolados foram inoculados com auxílio de uma alça de platina, em placas de Petri contendo meio YMA suplementado em diferentes concentrações de

NaCl com zero (controle); 0,85 mol L<sup>-1</sup>; 1,7 mol L<sup>-1</sup>; 3,5 mol L<sup>-1</sup>; 5,1 mol L<sup>-1</sup> e 8,5 mol L<sup>-1</sup>. Cada placa foi dividida em quatro secções, sendo inoculados 4 isolados diferentes por placa e em seguida, incubadas em estufa tipo BOD à temperatura de 28° C (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012b). Para o teste de tolerância a diferentes temperaturas de incubação, foram utilizadas placas de Petri com meio YMA original. As placas foram divididas em quatro secções e as bactérias foram inoculadas conforme descrito acima e, as placas foram incubadas em estufa tipo BOD às temperaturas de 28° C (controle), 35°C, 40°C e 45°C (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012b).

Em ambos testes as placas foram incubadas por 3 dias para as bactérias de crescimento rápido e seis dias para as de crescimento lento. Os experimentos foram montados com três repetições e foram considerados como tolerantes os isolados que cresceram ao longo do riscado na placa e como não tolerantes os que não apresentaram crescimento visível. Foram considerados tolerantes ou não os isolados cujos resultados foram os mesmos nas três repetições.

#### **4.3.2 Avaliação da produção de compostos indólicos e solubilização de tri-fosfato de cálcio “in vitro”**

As avaliações sobre a capacidade dos isolados em produzir AIA e solubilizar tri-fosfato de cálcio “in vitro” foram realizadas para os 102 isolados selecionados nas reações de duplex-PCR. As avaliações da produção de ácido indol-acético (AIA) foram realizadas de acordo com o método colorimétrico de Sarwar e Kremer (1995) com modificações. Os isolados foram crescidos em placas de Petri com meio YMA, para verificação de pureza e as colônias puras foram transferidas com o auxílio de uma alça para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio YM para formação do pré-inóculo. Após 48h de crescimento 150 µl do pré-inóculo foram inoculados em tubos de ensaio com meio YM sem azul de bromotimol acrescidos com L-triptofano (168 µg L<sup>-1</sup>) e sem triptofano com três repetições por isolado. Os tubos foram incubados a 28 °C (±2 °C) sob agitação (120 rpm) durante quatro dias para os isolados de crescimento rápido e sete dias para os de crescimento lento.

Após o período de incubação, a densidade ótica (DO) das culturas (540 nm) foi avaliada e ajustada para a absorbância de 0,5. Em seguida ao ajuste das concentrações das amostras, alíquotas de 1 mL da cultura foram transferidas para microtubos de 1,5 ml e centrifugadas a 6000 g por 5 minutos. Para a estimativa da produção do AIA 200 µL do sobrenadante das amostras centrifugadas foram transferidos para os poços de microplacas de poliestireno (microplacas de Elisa com 96 poços) e em seguida foram adicionados 100 µL de reagente de Salkowski [(1 mL de FeCl<sub>3</sub>

0,5 mol.L<sup>-1</sup> + 49 mL de HClO<sub>4</sub> (35%)] em cada poço. As placas foram incubadas no escuro durante 30 minutos. A intensidade da coloração vermelha foi lida em espectrofotômetro a 530 nm MultiSkan GO (Thermo Scientific, Alemanha). Para a estimativa da produção de AIA, os dados de absorvância foram interpolados em uma curva padrão, previamente obtida, com concentrações conhecidas de AIA que variam de zero a 500 µg.L<sup>-1</sup>.

A capacidade de solubilizar tri-fosfato de cálcio pelos isolados, previamente selecionados pelo Duplex-PCR, foi verificada utilizando o meio de cultura GL desenvolvido por Sylvester-Bradley et al., (1982). Após fundido com os elementos responsáveis pela formação do precipitado insolúvel de CaHPO<sub>4</sub> o meio foi vertido em placas de Petri para suspensão dos isolados.

As culturas foram crescidas em meio YM, como já descrito anteriormente, para suspensão nas placas. Dez microlitros de cada isolado foram inoculados nas placas contendo meio GL. A capacidade de solubilização pôde ser identificada através da presença de um halo translúcido ao redor da colônia. Os testes foram realizados em triplicata. O Índice de solubilização (IS) = diâmetro do halo/diâmetro da colônia foi determinado medindo-se o diâmetro da colônia e do halo de solubilização a cada cinco dias, durante um período de quinze dias.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o teste de média Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2008).

#### **4.3.3 Capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e testes enzimáticos por meio do kit API 20 NE**

O perfil enzimático bacteriano e a capacidade de solubilizar diferentes fontes de carbono foram determinados para dezoito isolados de mulungu. Os testes foram realizados utilizando-se o kit comercial API 20NE (Biomérieux). Para realização deste teste, dezoito isolados de Mulungu foram testados de acordo com a capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e o perfil enzimático foram determinados pelo kit API 20NE (Biomérieux), utilizado em sua maior parte para testes bioquímicos de isolados bacterianos. Os testes foram realizados de acordo com recomendações do fabricante, com inóculo ajustado para densidade ao ponto 0,5 na escala de McFarland.

A interpretação dos resultados, positivas ou negativas, foram feitas com 2 a 3 dias para isolados de crescimento rápido e 5 a 7 dias para bactérias de crescimento lento. Os resultados foram



transformados numa matriz binária, e os isolados agrupados segundo sua atividade enzimática e capacidade de utilização de diversas fontes de carbono. A partir desta planilha, foi construído um dendrograma de similaridade aplicando o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA, utilizando o programa Past (HAMMER et al., 2001).

#### **4.4 Eficiência simbiótica dos isolados em condições de casa de vegetação**

Para avaliar a capacidade simbiótica das bactérias foi montado um experimento em condições estéreis de casa de vegetação. Essas bactérias foram avaliadas quanto a capacidade de renodular as espécies vegetais utilizadas como plantas-iscas e a eficiência simbiótica para a FBN. O experimento foi instalado nas dependências da Embrapa Semiárido, onde, foram avaliados 40 isolados de jurema-preta, 44 de angico e 18 de mulungu, previamente selecionados pelo duplex-PCR.

A dormência das sementes foi quebrada através de escarificação mecânica com lixa (mulungu) e embebição em água quente (angico e jurema-preta). As sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool 96 ° GL (30 segundos) e peróxido de hidrogênio 33% (5 minutos), lavadas oito vezes em água destilada estéril (VINCENT, 1970). Foram semeadas quatro sementes por vaso, e o desbaste foi feito 20 dias após a emergência (DAE), restando apenas uma planta por vaso. O plantio das 3 espécies ocorreu em vasos de poliestireno com capacidade para 500 mL, preenchidos com areia lavada e autoclavada (pressão de 1,0 atm e temperatura de 120 °C por 1 hora, duas vezes, com o intervalo mínimo de 48 horas entre as autoclavagens).

Para o preparo do inoculante, os isolados foram crescidos em meio YM, corado com azul de bromotimol, em erlenmeyer contendo 50 mL de meio. As bactérias foram cultivadas durante três dias, para os isolados de crescimento rápido, e cinco dias, para os isolados de crescimento lento. A inoculação se deu em duas etapas, na primeira a inoculação foi realizada diretamente no vaso, sendo 1 mL de cultivo de bactéria por semente, e na segunda etapa, foi realizada uma nova inoculação aos corridos quinze dias após a primeira inoculação, desta vez superficialmente com 4 mL de cultivo por vaso. As plantas receberam solução nutritiva de Norris e Date (1976) ½ força, sendo aplicados 50 mL por planta uma vez por semana. Todas as plantas foram irrigadas manualmente com ADE, para evitar riscos de contaminação, conforme o necessário.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Para o mulungu os tratamentos consistiram de 18 isolados bacterianos isolados de nódulos da

mesma espécie, da estirpe BR 5609 (*Bradyrhizobium elkanii*) como estirpe de referência, um controle nitrogenado com a aplicação de solução nitrogenada de nitrato de amônio (10 mgN/planta por semana para as plantas de angico e 70 mgN/planta por semana para o mulungu) e um controle absoluto sem qualquer fonte de nitrogênio. Para os ensaios com angico foram utilizados 44 isolados respectivamente além de um controle nitrogenado e um absoluto, conforme descrito anteriormente para espécie do mulungu.

As plantas foram colhidas após um período de 90 DAE para mulungu e 120 DAE para angico. A parte aérea das plantas foram cortadas e acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65° C por 72 horas para avaliação da massa seca da parte aérea, após este período de secagem e pesagem a parte aérea foi triturada e acondicionado o peso de 50 mg em pequenas folhas de estanho para determinação do teor de nitrogênio pelo método de combustão seca no analisador Elementar Vario EL (Leco, EUA), no Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal da Embrapa Semiárido. As raízes foram lavadas e os nódulos destacados e contados, ambos foram acondicionados em estufas, como descrito anteriormente para a secagem e posterior pesagem para a determinação de sua massa seca.

As amostras foram analisadas segundo as variáveis: massa da parte aérea seca, massa da raiz seca, número de nódulos, massa dos nódulos secos e nitrogênio total acumulado na parte aérea. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o pacote estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2008).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

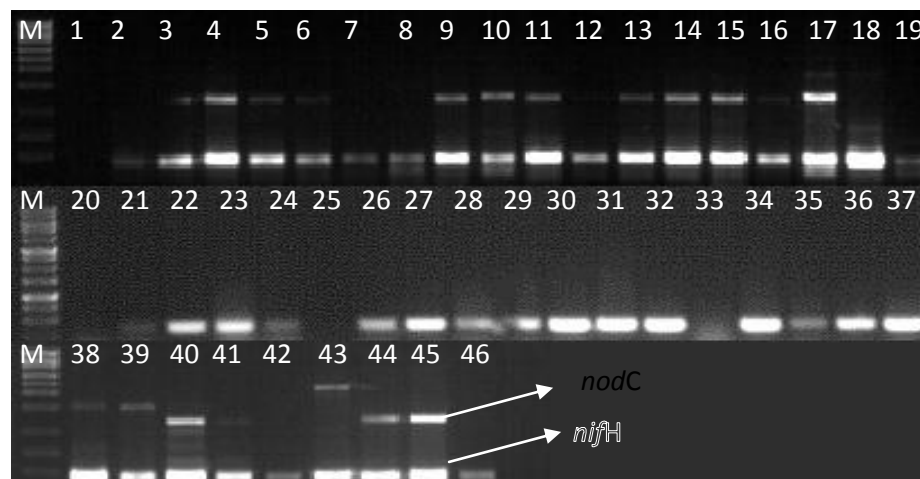
### 5.1 Amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* como ferramenta para a seleção preliminar das bactérias.

Nas avaliações de amplificação simultânea dos dois genes, dentre os 97 isolados de mulungu, 16 amplificaram apenas o gene *nifH*, um o gene *nodC* e um isolado amplificou ambos os genes *nifH+nodC* simultaneamente (Figura 1). Para os 82 isolados do angico, 33 isolados amplificaram apenas o *nifH* e 11 os dois genes simultaneamente, dos 129 isolados da jurema-preta 34 amplificaram o *nifH* e 6 os dois genes simultaneamente (Figura 1).

Estudos realizados por Cordero, et al., (2016), apontam que as análises filogenéticas dos dois genes simbióticos *nifH* e *nodC* foram capazes de identificar estirpes anteriormente inferidas em análises do gene IGS e 16S rRNA, remetendo a um total de oito linhagens distintas dentro dos treze isolados obtidos inicialmente em seu estudo. Dessa forma, além de importante para as inferências filogenéticas após o seu sequenciamento, estes genes simbióticos podem ser ferramentas úteis na maximização nos trabalhos laboriosos antes descritos e torna-se uma resposta eficaz e segura quando relacionado a autenticidade dos isolados na FBN e em sua nodulação.

Em outros estudos desenvolvidos em nosso laboratório, o padrão de amplificação de um percentual maior de isolados tem sido encontrado para rizóbios de espécies cultivadas como o feijão-caupi (BARDEN, 2014) e o amendoim (CUNHA, 2013). Entretanto como poucas são as informações para as espécies nativas, estudos com outros iniciadores devem ser conduzidos para a determinação do conjunto adequado para as reações de duplex-PCR.

As espécies angico e jurema-preta, representantes da subfamília Mimosoideae, são destacados na literatura por sua alta afinidade em realizar simbiose com  $\beta$ -rizobios (Bontemps et al., 2016). Visando verificar esta informação, os isolados de angico e jurema-preta foram submetidos à amplificação do gene *nodC* com a utilização do par de iniciadores NodCForBurk e nodCRevBurk, desenhado para a amplificação deste gênero em  $\beta$ -rizobios. Dos 44 isolados de angico e 40 de jurema-preta, 37 e 38 isolados amplificaram o *nodC*, respectivamente, indicando assim que estes isolados podem ser pertencentes à subclasse  $\beta$ -proteobacteria (Figura 3). Este resultado indica também que o angico e a jurema-preta podem apresentar alta afinidade das espécies de em realizar simbiose com estirpes do grupo dos  $\beta$ -rizobios.



**Figura 1.** Amplificação dos genes *nifH* e/ou *nodC* (M= marcador de peso molecular de 1kb; 1= branco; 2, 3 e 4= controles positivos; 5 à 46= isolados aleatórios) em isolados provenientes de nódulos de mulungu, angico e jurema-preta.



**Figura 2.** Amplificação do gene *nodC* utilizando um par de iniciadores NodCForBurk e nodCRevBurk para os isolados rizobianos de angico e jurema-preta.

## 5.2 Produção de compostos indólicos e capacidade de Solubilização de tri-fosfato de Cálcio “in vitro”

Os valores da produção de AIA em meio suplementado e sem suplementação do L-triptofano foram testadas em isolados de Mulungu (18 isolados), Angico (44 isolados) e Jurema-preta (40 isolados). Os resultados para estas avaliações estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. 14 isolados do mulungu (Tabela 1), 11 de Angico (Tabela 2) e 12 de Jurema-preta (Tabela 3) foram capazes de produzir AIA em meio de cultura YM suplementado com L-triptofano. A concentração do AIA produzido pelos isolados foi obtida através de doses conhecidas de AIA sintético determinada a partir da equação  $y = 0,0014x + 0,0751$  ( $R^2=0,99$ ). A estirpe de referência utilizada, a BR 3299 (*Microvirga vignae*), obteve uma concentração de 14,16 e 55,8  $\mu\text{mol/mL}$  sem e com suplementação de L-triptofano, respectivamente.

**Tabela 1.** Capacidade de solubilização de tri-fosfato de cálcio e produção do AIA com (AIA CT) e sem (AIA ST) L-triptofano como precursor por bactérias isoladas de nódulos de mulungu

Isolado	Índice de Solubilização (IS)			AIA CT	AIA ST
	5º Dia	10º Dia	15º Dia		
M78	-	-	-	12,34 d	37,18 b
M96	-	-	-	10,1 d	-
M59	-	-	-	123,0 b	57,51 a
M6	-	-	-	16,9 d	10,08 a
M68	-	-	-	10,1 d	-
M33	-	-	-	19,11 d	-
M40	-	-	-	-	-
M106	-	-	-	12,3 d	20,16 c
M14	-	-	-	-	-
M56	-	-	0,07 b	-	23,63 c
M31	-	-	0,15 b	-	-
M44	-	-	-	32,7 c	-
M84	-	-	-	163,6 a	10,08 d
M83	-	-	-	44,0 c	-
M82	-	-	-	12,3 d	-
M47	0,28 a	0,30 a	0,35 a	114,0 b	20,16 c
M57	-	-	-	150,1 a	10,08 d
M34	-	-	-	177,2 a	-
<b>BR3299</b>	0,40 a	0,43 a	0,62 a	55,8 c	14,16 d

Os dados são médias de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knot ( $p<0,05$ )

**Tabela 2.** Capacidade de solubilização de tri-fosfato de cálcio e produção do AIA com (AIA CT) e sem (AIA ST) L-triptofano como precursor por bactérias isoladas de nódulos de angico.

Isolado	Índice de Solubilização (IS)			AIA CT	AIA ST
	5º Dia	10º Dia	15º Dia		
A52	-	-	-	-	-
A84	-	-	-	-	-
A8	-	-	-	8,98 d	21,18 a
A18	-	-	-	1,10 d	-
A60	-	0,25 b	0,30 c	-	-
A14	-	-	-	2,21 d	-
A55	-	0,02 c	0,03 d	15,75 d	-
A35	-	-	0,33 c	-	-
A36	-	-	-	4,46 d	-
A37	0,16 b	0,67 a	0,71 b	-	-
A28	0,15 b	0,61 a	0,61 b	-	1,55 b
A13	-	-	-	48,48 c	-
A59	-	-	-	1,10 d	-
A7	0,03 b	0,28 b	0,29 c	75,57 b	-
A83	-	-	-	5,62 d	-
A64	-	-	-	-	-
A67	-	-	-	4,46 d	-
A34	-	0,03 c	0,77 b	96,15 b	-
A42	0,02 b	0,07 c	0,07 d	127,51 a	-
A77	0,32 a	0,74 a	1,33 a	-	-
A26	-	-	-	1,10 d	-
A4	-	-	-	5,57 d	-
A30	-	0,44 b	1,10 b	-	0,2 b
A74	-	-	-	-	2,01 b
A10	-	-	-	75,57 b	-
A72	0,45 a	0,41 c	0,55 b	75,57 b	-
A17	-	-	0,16 c	12,34 d	-
A6	-	-	-	1,10 d	-
A44	-	-	-	39,44 c	-
A27	-	-	-	59,76 c	-
A25	-	-	-	55,24 c	4,46 a
A5	0,11 b	0,17 c	0,30 c	-	-
A58	-	-	-	1,10 d	-
A48	-	-	-	1,10 d	-
A49	-	-	-	3,31 d	-
A63	0,11 b	0,21 c	0,22 c	-	-
A33	-	-	-	2,21 d	-
A3	0,51 a	0,85 a	1,64 a	1,10 d	-
A29	-	0,35 b	0,36 c	-	-
A38	-	-	-	-	-
A62	-	-	-	2,21 d	10,08 a
A66	-	-	-	3,36 d	1,10 b
A1	-	-	-	82,35 b	-
A76	-	-	-	62,02 c	1,10 b
BR 3299	0,40 a	0,43 b	0,63 b	55,8 c	14,16 a

Os dados são médias de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knot ( $p < 0,05$ )

**Tabela 3.** Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e produção do AIA com (AIA CT) e sem (AIA ST) L-triptofano como precursor por bactérias isoladas de nódulos de jurema-preta

Isolado	Índice de Solubilização (IS)			AIA CT	AIA ST
	5º Dia	10º Dia	15º Dia		
J96	-	-	-	1,10 f	-
J84	-	-	-	3,36 f	-
J26	-	-	1,25 a	100,41 b	-
J88	0,63 b	1,10 a	-	-	-
J86	1,38 a	1,38 a	1,57 a	2,21 f	-
J28	0,85 b	1,23 a	1,53 a	-	-
J116	-	-	-	1,10 f	-
J114	-	-	-	-	-
J108	-	-	-	12,34 e	-
J90	0,16 c	0,49 b	0,51 c	104,93 b	-
J102	-	0,34 c	0,78 b	-	-
J97	-	0,27 c	0,41 c	3,36 f	-
J130	-	-	-	1,10 f	-
J56	-	-	-	43,96 c	-
J103	-	-	-	-	-
J113	-	0,13 c	1,40 a	-	-
J51	0,23 c	0,22 c	0,42 c	23,63 e	-
J30	0,28 c	0,43 b	0,53 c	-	-
J92	-	0,11 d	1,90 a	55,25 c	-
J123	-	-	0,40 c	30,41 d	-
J107	-	-	-	8,98 e	-
J85	-	0,16 c	0,45 c	2,21 f	-
J83	0,29 c	0,57 b	0,63 c	-	-
J119	-	-	-	1,10 f	-
J100	-	-	0,41 c	1,10 f	-
J82	-	0,07 d	0,31 c	4,46 f	-
J95	0,36 c	0,47 b	0,48 c	-	-
J93	-	-	-	-	-
J129	0,58 b	1,08 a	1,31 a	-	-
J77	-	-	-	1,10 f	-
J128	-	-	-	141,06 a	-
J78	-	-	-	12,34 e	-
J98	-	-	-	4,46 f	-
J94	-	-	-	4,46 f	-
J16	-	-	-	3,36 f	-
J29	-	-	-	1,10 f	-
J32	-	-	-	-	-
J55	-	-	-	102,67 b	-
J89	-	-	-	1,10 f	-
J21	-	-	-	98,15 b	-
<b>BR 3299</b>	0,40 c	0,43 c	0,63 c	55,8 c	14,16 a

Os dados são médias de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste scott knot (p<0,05)

Dentre os isolados de Mulungu, destacam-se as estirpes M47, M59, M57, M84 e M34 que obtiveram maiores concentrações de AIA quando comparadas significativamente a estirpe de referência, sendo  $114,0 \mu\text{mol mL}^{-1}$  o menor valor correspondente a estirpe M47 e  $177,2 \mu\text{mol mL}^{-1}$

o maior valor de AIA correspondente a estirpe M34, quando em meio suplementado com L-triptofano.

Os isolados de Angico, A44, A13, A25, A27 e A76 obtiveram concentrações significativamente iguais a estirpe de referência 3299 e os isolados A10, A72, A7, A1, A34 e A42 produziram valores superiores as estirpes de referência, sendo eles A7 (75,57  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) menor concentração e A42 (127,51  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) maior concentração de AIA em meio suplementado com L-triptofano. Três estirpes obtiveram valores significativamente iguais a estirpe de referência 3299, sendo elas J92, J56 e J123 e os isolados J21, J26, J55, J90 e J128 obtiveram valores superiores a estirpe de referência, sendo J128 capaz de produzir 141,06  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  de AIA, maior valor obtido dentre os isolados de Jurema-preta.

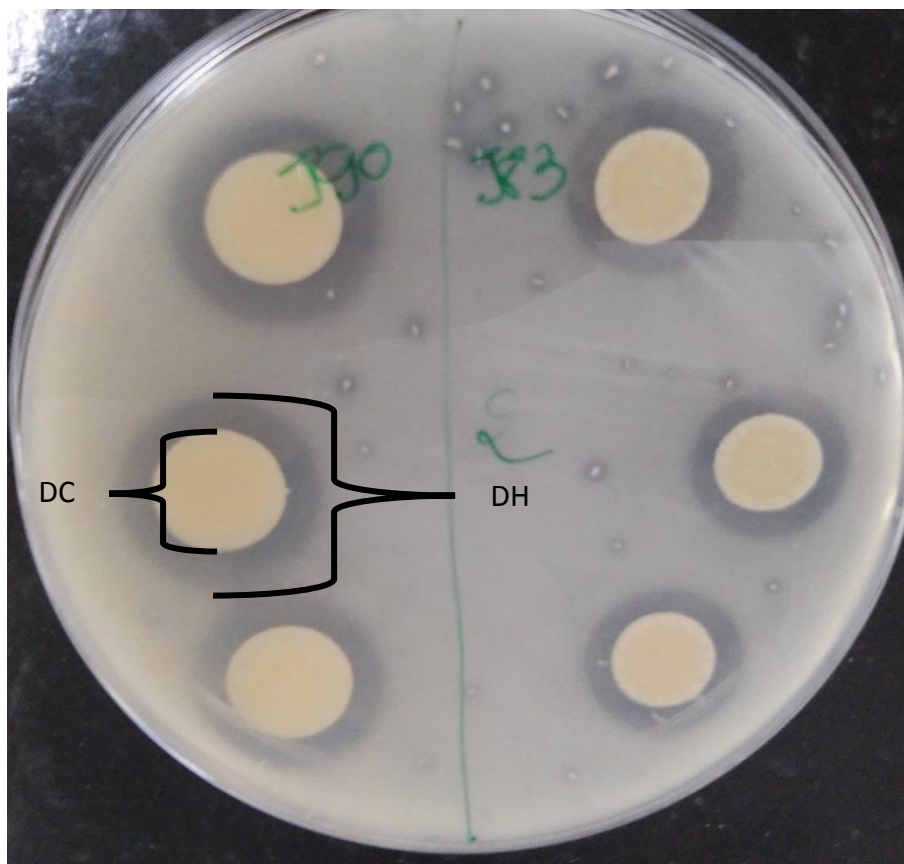
Bactérias nodulíferas podem sintetizar AIA através de três vias metabólicas, indol-3-acetamida (IAM), indol-3-piruvato (IpyA) e triptamina (TAM) sendo que, o precursor IpyA é independente de L-triptofano (Patten e Glick, 1996; Longatti, et al., 2013). As estirpes de mulungu, M78, M56 e M106, e de angico, A8 produziram maior concentração de AIA em meio sem suplementação de L-triptofano. Estirpes de Angico, A28, A30, A74 e A62 e de mulungu a M56 só foram capazes de produzir quantidades de AIA em meio sem suplementação de L-triptofano, sugerindo portanto a utilização de outra via metabólica. Resultado similar pode ser constatado para estirpes INPA R841 e INPA R861, proveniente de isolados de feijão-caupi em um trabalho realizado por Chagas Júnior (2009), onde tais estirpes obtiveram uma concentração de 136  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 95  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em meio YM sem suplementação de L-triptofano, enquanto a concentração de AIA produzido em meio suplementado com 150  $\text{mg L}^{-1}$  de L-triptofano foram apenas 76  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 85  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Zakharova et al. (1999) e Halda-Alija (2003) observaram em seus experimentos que algumas espécies bacterianas diazotróficas eram capazes de produzir AIA na ausência de L-Triptofano. Kuss et al. (2007) observaram que 90% dos isolados de *Azospirillum* testados em seus estudos produziam AIA por uma rota diferente da de L-Triptofano.

Diversos autores já destacam a capacidade de produção do AIA pelo grupo dos rizóbio, onde, este fitohormônio desempenha um papel importante no crescimento da planta e na interação leguminosa-rizóbio (GHOSH et al., 2015). Resultado similar ao presente estudo pode ser constatado por Vargas et al. (2009), avaliando a produção de AIA de 252 isolados de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolli*, nativos de diferentes solos do Rio Grande do Sul, provenientes de nódulos de trevo branco (*Trifolium repens*) e de trevo vesiculoso (*T. vesiculosum*), verificando o potencial de produção de AIA em 59 dos isolados avaliados. Estudos realizados por Longatti e



colaboradores (2013), com estirpes de *Burkholderia* e *Rhizobium* isolados de solos da Amazônia, destacaram que todas as estirpes analisadas foram capazes de sintetizar AIA em meio suplementado com L-triptofano e doze estirpes sintetizaram AIA em meio sem a suplementação de L-triptofano variando suas concentrações de 0 a 12,59, que se assimilam as concentrações encontradas no presente estudo.

Foram avaliados os mesmos isolados dos testes para a produção de AIA “in vitro” quanto a habilidade para solubilizar tri-fosfato de cálcio em meio de cultivo GL suplementado com  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . A capacidade de solubilização foi identificada pela presença de um halo transparente ao redor da colônia, como mostra a figura 3.



**Figura 3.** Esquema utilizado para cálculo do índice de solubilização [I.S.= Diâmetro do halo(DH)/Diâmetro da colônia(DC)]

Das bactérias oriundas de mulungu e avaliadas neste ensaio, apenas um isolado foi capaz de solubilizar tri-fosfato, representando 5,56% dos isolados, 16 (88,88%) cresceram, mas, não solubilizaram o tri-fosfato e um isolado (5,56%) não cresceu (Tabela 1). Dentre os isolados de Angico, 36,36% (16 isolados) solubilizaram tri-fosfato, 21 isolados cresceram (47,73%), mas, não solubilizaram tri-fosfato e 7 (15,91%) não cresceram em meio GL (Tabela 2). Dezesete (42,5%) isolados da Jurema-preta foram capazes de solubilizar tri-fosfatos, 8 (20%) dos isolados não cresceram em meio GL e os outros 15 (37,5%) cresceram, mas não solubilizaram (Tabela3). Chagas Júnior e colaboradores (2010), estudando 205 isolados oriundos de nódulos de feijão-caupi de solos da Amazônia, constataram que apenas 68 isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio, onde 35 isolados foram considerados precoces (início da solubilização até 3 dias), 33 isolados considerados tardios (início da solubilização após os 3 dias) e 137 não solubilizadoras, não apresentaram solubilização visível 15 dias após a inoculação.

Dentre as avaliações das três espécies pode-se observar uma baixa frequência de solubilização de tri-fosfato de cálcio. Tal resposta negativa pode estar relacionada ao fato de que estes isolados não apresentam a atividade solubilizadora, ou a glicose não é a fonte de carbono ideal para expressão desta característica. Apesar de o meio GL ter sido descrito há mais de 30 anos por Sylvester-Bradley e colaboradores (1982) e ser utilizado em diversos estudos para avaliar a capacidade de solubilização de fosfatos por bactérias diazotróficas, a utilização da glicose como fonte de carbono para a expressão de tal característica pode não favorecer a determinados isolados uma vez que há resultados de pesquisa que descreveram a influência da fonte de carbono sobre o poder de solubilização de fosfato de cálcio em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas (Haldar, 1991 e Oliveira, 2009). Haldar (1991) salientou em seus experimentos que a glicose foi a melhor fonte de carbono para solubilização em estirpes de *Bradyrhizobium* sp. No entanto, Oliveira (2009) verificou que de 13 isolados que não apresentaram crescimento em meio enriquecido com glicose, sete isolados cresceram quando a fonte de carbono foi substituída por manitol, onde duas apresentaram potencial solubilizador e eram pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*.

Estudos realizados por Singh et al., (2014) demonstraram que estirpes solubilizadoras de fosfato, *Pantoea cyripedii*, *Enterobacter aerogenes* e *Rhizobium ciceri* foram capazes de promover o crescimento vegetal. Vargas e colaboradores (2009), dos 252 isolados de rizóbio, 42,46% dos isolados obtiveram a capacidade de solubilizar fosfatos e resultados obtidos por Marra e colaboradores (2012), afirmaram que estirpes dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Paenibacillus* e *Rhizobium* foram eficientes tanto na verificação do seu potencial para FBN quanto

na solubilização de fosfatos, apontando a importância da obtenção de estirpes que possuam a capacidade de promoção destes dois mecanismos para uma melhor desenvoltura destas estirpes no campo.

Contudo, para cada espécie há no mínimo um isolado eficiente na solubilização, o que permite inferir que no presente estudo existem isolados que apresentam um mecanismo alternativo para o crescimento vegetal, como é a solubilização de tri-fosfato de cálcio e produção do AIA, potencializando estirpes importantes na FBN.

### **5.3 Tolerância a temperaturas de incubação e diferentes concentrações de NaCl no meio sólido**

Os testes de tolerância a diversas temperaturas e teores de NaCl são fundamentais na caracterização e descrição de isolados de leguminosas, pois podem ser fatores limitantes no desenvolvimento e eficiência destes isolados em campo (LIRA JR, et al., 2015). Neste estudo, os isolados foram avaliados quanto a tolerância ao estresse de temperatura e capacidade para crescer em meio YMA com diferentes concentrações de NaCl. Após o período de crescimento dos isolados, notou-se que a medida que os teores de salinidade foram aumentado e da mesma forma a temperatura, houve uma queda significativa na atividade dos isolados. Estirpes de rizóbios apresentam temperatura ótimas para seu crescimento de 28 a 31 °C (ARBI, et al., 2015).

Do total de 18 isolados de mulungu, 44 de angico e 40 de jurema-preta, 61,11, 27,27 e 10% cresceram até a temperatura de 35°C; 16,67, 29,54 e 47,50% cresceram até a temperatura de 40°C, 22,22, 18,18 e 27,5% dos isolados foram capazes de crescer a temperatura de 45°C, respectivamente. 25% dos isolados de angico e 15% de jurema-preta cresceram apenas na temperatura controle de 28°C (Tabela 4). Nas faixas de temperatura entre 35 e 40°C foram encontrados os maiores índices de crescimento. Outros estudos apontaram que os rizóbios em geral apresentam taxas de crescimento até aproximadamente 40°C, onde, valores superiores reduzem significativamente sua capacidade de crescimento (SINGH et al., 2013; SHEU et al., 2013).

Resultados semelhantes foram encontrados por Boukhatem et al., (2012) em que rizóbios nativos de acácias regiões semiáridas da Argélia e por Tsegaye et al., (2015) em rizóbios ondulantes de *Vicia faba* L. em solos da Etiópia. Nesses estudos os autores observaram que todas as estirpes possuíam capacidade de crescer a 35 °C, diminuindo sua taxa de crescimento de acordo com o aumento da temperatura.

Em geral, as estirpes de *Bradyrhizobium ganzhouense*, *B. neotropicale*, *Rhizobium lusitanum*, *Rhizobium laguerreae*, *Burkholderia rhynchosiae* e *Burkholderia dilworthii* são capazes de crescer até 37°C (LU et al., 2014; MEYER et al., 2013; MEYER et al., 2014; SAIDI et al., 2014; Zilli et al., 2014; Valverde et al., 2006). E estirpes de *Burkholderia diazotrophica* e *Rhizobium alvei* puderam crescer a uma temperatura de 40 e 45°C, respectivamente (SHEU et al., 2013; SHEU et al., 2015).

O crescimento de estirpes tolerantes a diferentes concentrações de sal (NaCl) pôde ser verificado pelo aparecimento de colônias bacterianas nas placas após a inoculação. A grande maioria dos isolados das três espécies, mais da metade, foram capazes de tolerar concentrações de 1% de NaCl. Estirpes de *Bradyrhizobium neotropicale*, *Rhizobium lusitanum*, *R. laguerreae*, *R. alvei* e *Burkholderia diazotrophica* são capazes de crescer até 1% de NaCl (ZILLI et al., 2014; VALVERDE et al., 2006; SAIDI et al., 2014; SHEU et al., 2015; SHEU et al., 2013).

Quando submetidas ao aumento de 2 e 3% de NaCl, dentre as espécies de mulungu, apenas 38,89 e 16,67% cresceram, respectivamente, até tais concentrações, para isolados do angico, 27,28 e 13,63% e dentre os isolados da jurema-preta 17,5 e 2,5% foram capazes de tolerar até as concentrações de 2 e 3%. Os isolados de mulungu, foram aqueles que apresentaram melhores resultados em tolerar altas concentrações de NaCl quando comparadas as estirpes de angico e jurema-preta, onde apenas a estirpe M83 foi capaz de crescer em meio com 5% de NaCl. 5,56% dos isolados de mulungu e 25% dos isolados de jurema-preta só foram capazes de crescer no meio sólido controle (Tabela 4). Assim como no ensaio de temperatura, à medida que as concentrações de sal foram aumentando no meio, o número de isolados capazes de tolerar este estresse foi diminuindo.

Estudos realizados por Xavier e colaboradores (2007) com rizóbio de feijão-caupi em regiões de sertão, zona da mata e agreste ao avaliarem temperaturas de 39 a 42°C e concentrações de NaCl de 1, 2 e 3%, observaram que os isolados provenientes do sertão são mais tolerantes a temperaturas elevadas, quando comparados aos isolados das outras localidades e ainda a existência de isolados que toleraram até 3% de NaCl. Estes dados confirmam a frequência de isolados encontrados no presente estudo para cada espécie tolerantes a temperatura mais elevadas, quando comparadas a temperatura considerada ótima para o crescimento de espécies de rizóbios e à altos teores de NaCl.

**Tabela 4.** Isolados de mulungu (M), angico (A) e jurema-preta (J) tolerantes a diferentes faixas de temperaturas e diferentes concentrações de salinidade.

ISOLADO	Temperatura	NaCl	ISOLADO	Temperatura	NaCl	ISOLADO	Temperatura	NaCl
M82	45°C	3%	A18	40°C	1%	J89	40°C	2%
M33	35°C	2%	A7	40°C	3%	J29	40°C	1%
M44	35°C	1%	A55	Nd*	0,50%	J95	40°C	Nd*
M68	35°C	2%	A76	Nd*	2%	J108	45°C	Nd*
M83	45°C	5%	A14	35°C	1%	J107	45°C	1%
M14	35°C	0,50%	A25	Nd*	0,50%	J100	40°C	Nd*
M78	35°C	1%	A44	35°C	0,50%	J123	Nd*	Nd*
M57	45°C	2%	A27	Nd*	0,50%	J102	40°C	Nd*
M40	40°C	0,50%	A42	40°C	3%	J119	Nd*	1%
M56	35°C	3%	A4	45°C	3%	J82	40°C	2%
M6	40°C	3%	A26	45°C	0,50%	J114	35°C	1%
M106	35°C	2%	A10	Nd*	3%	J113	35°C	0,50%
M31	35°C	2%	A74	40°C	0,50%	J85	40°C	1%
M59	45°C	2%	A83	35°C	2%	J90	40°C	0,50%
M96	40°C	2%	A5	35°C	0,50%	J83	40°C	2%
M84	35°C	0,50%	A6	35°C	1%	J51	35°C	2%
M34	35°C	Nd*	A28	35°C	2%	J88	45°C	1%
M47	35°C	0,50%	A3	40°C	1%	J116	40°C	0,50%
			A67	35°C	1%	J28	40°C	2%
			A66	45°C	0,50%	J30	45°C	0,50%
			A77	40°C	2%	J86	40°C	2%
			A52	40°C	2%	J77	45°C	0,50%
			A13	Nd*	1%	J84	45°C	Nd*
			A35	Nd*	2%	J96	45°C	1%
			A38	45°C	2%	J92	Nd*	Nd*
			A60	40°C	1%	J93	40°C	1%
			A1	45°C	0,50%	J130	45°C	1%
			A63	35°C	1%	J21	45°C	1%
			A64	Nd*	2%	J56	45°C	1%
			A48	40°C	2%	J103	40°C	1%
			A49	Nd*	3%	J26	40°C	3%
			A62	35°C	1%	J129	40°C	1%
			A72	40°C	2%	J97	40°C	0,50%
			A33	Nd*	0,50%	J94	Nd*	0,50%
			A34	35°C	0,50%	J16	40°C	1%
			A84	40°C	2%	J98	35°C	0,50%
			A36	35°C	1%	J32	40°C	Nd*
			A8	45°C	2%	J128	Nd*	Nd*
			A58	45°C	1%	J55	Nd*	Nd*
			A37	40°C	1%	J78	45°C	2%
			A17	40°C	1%			
			A30	Nd*	1%			
			A29	45°C	3%			
			A59	35°C	1%			

\*Nd= Não cresceu quando submetidas ao estresse, apenas no controle

#### 5.4 Capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e testes enzimáticos por meio do kit API para os isolados de mulungu

Os isolados de mulungu foram testados quanto a habilidade de metabolizar doze fontes de carbono de três divisões químicas (carboidratos, sais orgânicos e ácidos orgânicos), presentes no teste API 20NE (Tabela 5). Os isolados mostraram maior capacidade de metabolizar as fontes de carbono pertencentes ao grupo dos carboidratos, sendo que as fontes glicose, arabinose, manose e manitol foram metabolizadas por todos os isolados avaliados. A metabolização do manitol já era esperada, pois é a principal fonte de carbono que compõe o meio YMA, utilizado para o isolamento destas bactérias.

As fontes N-acetil-glucosamina e Maltose, dentre as fontes de carboidratos utilizadas no teste API 20NE, foram as que mais limitaram o crescimento dos isolados, mas, apenas 17% dos isolados não foram capazes de metabolizar tais fontes. Em estudos realizados com estirpes de *Bradyrhizobium ganzhouense*, *Rhizobium alvei*, *Burkholderia rhynchosiae*, *Burkholderia diazotrophica*, *Burkholderia dilworthii*, *Microvirga vignae* e *Rhizobium laguerreae*, confirmaram para todas as estirpes a não assimilação de maltose, exceto *Microvirga vignae*, e todas as estirpes foram capazes de assimilar N-acetilglucosamina, exceto *Bradyrhizobium ganzhouense* (LU et al., 2014; SHEU et al., 2015; MEYER et al., 2013; SHEU et al., 2013; MEYER et al., 2014; RADL et al., 2014; SAIDI et al., 2014).

As fontes de sais orgânicos (Potássio gluconato e Citrato de trisódio) foram ainda mais limitantes, mas não tão limitantes quanto as fontes provenientes de ácidos orgânicos. Segundo Berge et al. (2009) isolados de rizóbio normalmente apresentam baixa capacidade para metabolizar fontes de carbono do grupo dos ácidos. Dentre os isolados testados apenas 67% dos isolados metabolizaram ácido Málico, 17% ácido adipato e ácido fenil-acetato e nenhum isolado foi capaz de metabolizar ácido cáprico. A ausência de assimilação do ácido cáprico em todos os isolados de mulungu, pode ser comprovado também nas estirpes *Rhizobium alvei*, *Burkholderia diazotrophica*, *Burkholderia dilworthii*, *Rhizobium laguerreae*, dentre elas todas são capazes de metabolizar ácido málico, com exceção do *Rhizobium alvei* (SHEU et al., 2015; SHEU et al., 2013; MEYER et al., 2014; SAIDI et al., 2014).

Os isolados M44, M82 e M83 metabolizaram todas as diferentes fontes de carbono, com exceção para o ácido cáprico, que nenhuma estirpe foi capaz de metabolizar. Estirpes capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono secretadas pelas plantas para o ambiente rizosférico

apresentam uma característica desejável para produção de inoculantes, pois revela a capacidade saprofítica destas estirpes para um promiscuo estabelecimento no solo.

**Tabela 5.** Bactérias isoladas de nódulos de Mulungu analisadas quanto a capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono (+ = metaboliza; - = não metaboliza).

Metabolismo de fontes de C	M33	M44	M82	M34	M47	M57	M83	M106	M40	M31	M6	M68	M96	M56	M78	M84	M59	M14
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetil-Glucosamina	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Maltose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Potássio Gluconato	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Ácido Caprato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Adipato	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malato	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Citrato de trisódio	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Ácido fenil-Acetato	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quanto a atividade enzimática, os isolados avaliados produziram 11 perfis enzimáticos (Tabela 6). Três isolados nos perfis A (M47, M106 e M40) e B (M57, M68 e M98), dois isolados nos perfis E (M78 e M56), F (M44 e M59) e I (M82 e M83) e apenas um isolado nos perfis C (M31), D (M33), G (M84), H (M14), J (M34) e K (M6). Todos os isolados apresentaram reação negativa para fermentação de glicose, e apenas um isolado (M33) apresentou atividade positiva para gelatinase. Para as demais enzimas os isolados tiveram respostas variáveis (Tabela 6).

A atividade da hidrólise de esculina (89%) e da Urease (94%) foi a mais comum dentre os isolados. A atividade da urease e hidrólise de esculina já foram reportadas em *Bradyrhizobium betae*, *Bradyrhizobium neotropicale*, *Rhizobium lusitanum*, *Rhizobium alvei* e *Rhizobium laguerreae* (RIVAS et al., 2004; ZILLI et al., 2014; VALVERDE et al., 2006; SHEU et al., 2015; SAIDI et al., 2014). Os isolados dos perfis A, B e H, apresentaram respostas negativas para nitrato redutase e formação de indol, o mesmo resultado foi encontrado para estirpe *Rhizobium laguerreae*

(Saidi et al., 2014), enquanto os perfis F e I apresentaram resultado contrário, apresentando resposta positiva para as duas ações enzimáticas, resultado semelhante foi constatado por Zilli et al., (2014) com a estirpe *Bradyrhizobium neotropicale*.

**Tabela 6.** Perfis de atividade enzimática identificadas por API 20NE em bactérias isoladas de nódulos de mulungu.

Perfil Enzimático	Nº de isolados	Nitrato redutase	Formação de indol	Fermentação de glicose	Arginina DiHidrolase	Urease	Hidrólise Esculina	Gelatinase	$\beta$ -Galactosidade
A	3	-	-	-	-	+	+	-	+
B	3	-	-	-	+	+	+	-	+
C	1	+	-	-	-	+	+	-	+
D	1	+	-	-	-	+	+	+	+
E	2	+	-	-	+	+	+	-	+
F	2	+	+	-	+	+	+	-	+
G	1	+	-	-	-	+	+	-	-
H	1	-	-	-	-	+	+	-	-
I	2	+	+	-	+	+	-	-	-
J	1	-	+	-	-	+	+	-	-
K	1	-	+	-	-	-	+	-	-

### 5.5 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) dos isolados de angico e jurema-preta

A variabilidade genética de 26 isolados de angico e 35 isolados de jurema-preta foi avaliado por meio da técnica de ARDRA, utilizando três enzimas de restrição de corte frequente permitiu a formação de um grande grupo para os isolados de angico, com cerca de 40% de similaridade e um grande grupo com aproximadamente 65% de similaridade para os isolados de jurema-preta, calculado através do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando o algoritmo UPGMA (Figura 4).

Dentre o grupo formado pelos isolados de angico há a formação dois subgrupos o A e o B com aproximadamente 60 e 55% de similaridade, respectivamente. O subgrupo A possui duas divisões A1 e A2 (70% de similaridade entre si), o grupamento A1 foi formado por dois isolados A77 e A4 e o grupamento A2 por quatro isolados, A66, A60, A55 e A27. Ainda no agrupamento A,



as divisões A3 e A4 com 90% de similaridade entre si, foram formadas por seis isolados, sendo o agrupamento A3 formado por dois isolados, A83 e A38 e o agrupamento A4 englobou 4 isolados, A76, A26, A25 e A17, ambos agrupamentos com 100% de similaridade.

O subgrupo B possui oito subgrupos agrupados dois a dois. B1 e B2, B3 e B4, B5 e B6, e B7 e B8, com 85, 60, 95 e 85% de similaridade, respectivamente. A subdivisão B1 é composta por apenas um isolado, A35 e a B2 pelos isolados A64, A49 e A33, com 100% de similaridade. As subdivisões B3 e B4 agruparam dois isolados cada, A7 e A37 e A30 e A13, respectivamente. A subdivisão B5 é composta apenas pelo isolado A72 e a B6 pelos isolados A8 e A48. O grupo B7 englobou os isolados A42 e A3 e o B8 apenas o isolado A10.

Para os isolados de jurema-preta, um grande grupo se formou (A) apresentando 55% de similaridade entre todas as bactérias, subdividindo-se em dois A1 com quatro representantes (J92, J55, J51 e J26) com 100% de similaridade e grupo B, com aproximadamente 75% de similaridade, este grupo englobou duas divisões C e D, com 80 e aproximadamente 85% de similaridade, respectivamente. A divisão C agrupou o subgrupo C1, representada com os isolados J86 e J130, C2, com nove isolados e C3 composto apenas pelo isolado J128, os 3 grupos apresentaram 100% de similaridade. A divisão D se subdividiu em um grupo com 90% de similaridade, representados por D1, com apenas o isolado J84, e D2, composto pelos isolados J96, J90, J56, J30, J89, J114 e J113 e um grupo D3, composto por onze isolados com 100% de similaridade.

Para a discussão seguinte, vale ressaltar as localizações dos municípios de origem dos solos utilizados para a obtenção das bactérias. Garanhuns e Caruaru são municípios próximos localizados no Agreste do Estado de Pernambuco, com distância linear de aproximadamente 70 km entre si (centros das cidades), mais distantes em linha reta de Serra Talhada (220 km de Garanhuns e 260 km de Caruaru) e de Petrolina (460 km de Garanhuns e 510 km de Caruaru) localizados no Sertão. Dessa forma, as áreas de Garanhuns e Caruaru apresentam o mesmo clima, de maneira geral, a as mesmas fitofisionomias de Caatinga nativa. Da mesma forma, Petrolina e Serra Talhada apresentam climas parecidos com fitofisionomias de Caatinga nativa similares.

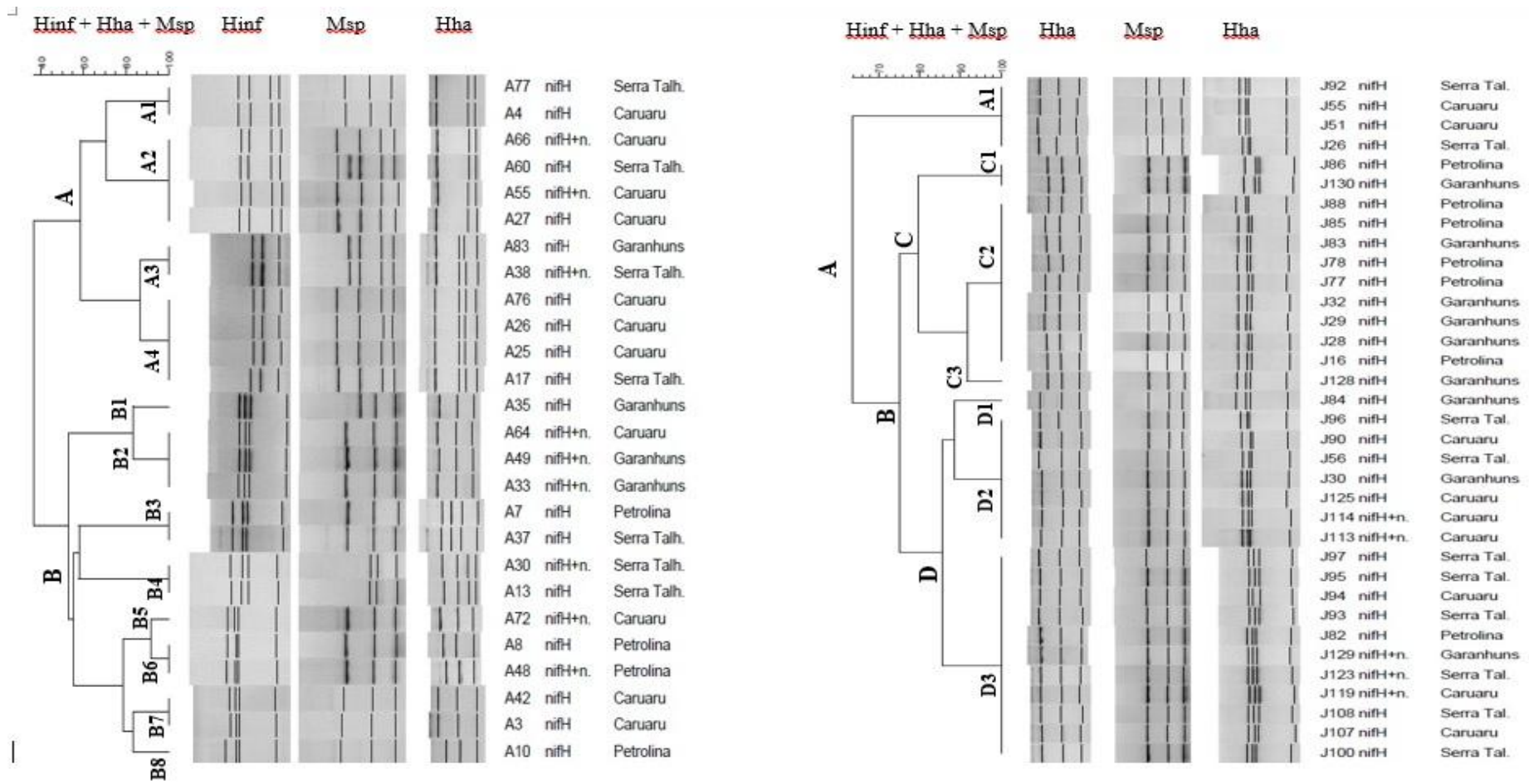
Avaliando o agrupamento das bactérias do angico, é possível verificar a formação de um padrão geográfico claro nos grupos. O Grupo B apresenta 4 bactérias oriundas de solos de Petrolina, 3 de Serra Talhada, 4 de Caruaru e 3 de Garanhuns, o que indica (apesar do baixo número de isolados), que as bactérias deste grupo são igualmente distribuídas tanto no Agreste como no Sertão. Entretanto, para o grupo A, é possível observar que não há bactérias oriundas de Petrolina, há 4 de Serra Talhada, 7 de Caruaru e 1 de Garanhuns. Indicando haver maior ocorrência das bactérias com estes perfis de ARDRA no agreste do que no sertão. Mesmo estando localizados em áreas próximas, as bactérias do agreste são mais abundantes em Caruaru do que em Garanhuns, indicando haver

fatores locais que propiciem a maior ocorrência das bactérias em uma localidade, mesmo estas tendo características climáticas similares à outra.

A distribuição biogeográfica é ainda mais clara ao avaliar o dendrograma das bactérias de jurema-preta, uma vez que nos três grupos formados há tendências para a formação de padrões de distribuição. No grupo A1, o menor de todos há apenas 2 bactérias de Serra Talhada e 2 de Caruaru, não havendo isolados oriundos de Petrolina e de Garanhuns. Entretanto, no agrupamento C há 6 bactérias isoladas de solos de Petrolina e 6 de Garanhuns, não havendo bactérias isoladas de Caruaru e de Serra Talhada. No agrupamento D, o maior grupo do dendrograma, este padrão novamente se inverte, uma vez que para Petrolina e Garanhuns apenas um isolado bacteriano de cada localidade foi agrupado, enquanto 8 e 7 isolados foram classificados como sendo de Serra Talhada e Caruaru, respectivamente.

Os padrões esperados para ambas as espécies seria o agrupamento das bactérias do Sertão (Petrolina + Serra Talhada) e do Agreste (Caruaru + Garanhuns) nos mesmos grupos ou em grupos próximos, como recentemente demonstrado para *Mimosa tenuiflora* e *M. paraibana* a partir do agrupamento dos isolados por meio da técnica de ARDRA (FREITAS et al. 2014) e para *M. caesalpinifolia* agrupando os isolados por meio das sequências do gene 16S rRNA (MARTINS et al., 2015). Contudo os resultados obtidos neste estudo, demonstram que este padrão não se repete para as bactérias do angico e, principalmente para a jurema-preta.

Além da fitofisionomia e das condições climáticas, outros fatores como as características edáficas das áreas de coleta, além do histórico de preservação, podem influenciar na diversidade de bactérias nodulantes de leguminosas ativas na área (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Entretanto, a capacidade de “recrutar” os diferentes isolados de rizóbio pode ser uma estratégia para o sucesso do estabelecimento destas espécies em diferentes solos (KLOCK et al., 2015).



**Figura 4.** Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de nódulos de angico (A) e jurema-preta (B) construídos a partir de perfis de restrição do gene 16SrRNA utilizando as endonucleases *Hinf*I, *Msp*I e *Hha*I. Dendrograma construído utilizando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

## 5.6 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análises filogenéticas de isolados do mulungu

Todas as bactérias avaliadas no sequenciamento do gene 16S rRNA apresentaram similaridade com os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, gêneros que abrigam bactérias tradicionalmente formadoras de nódulos em leguminosas, comumente encontrados em nódulos de leguminosas da subfamília Papilionoideae (PEIX et al., 2015) e *Burkholderia*.

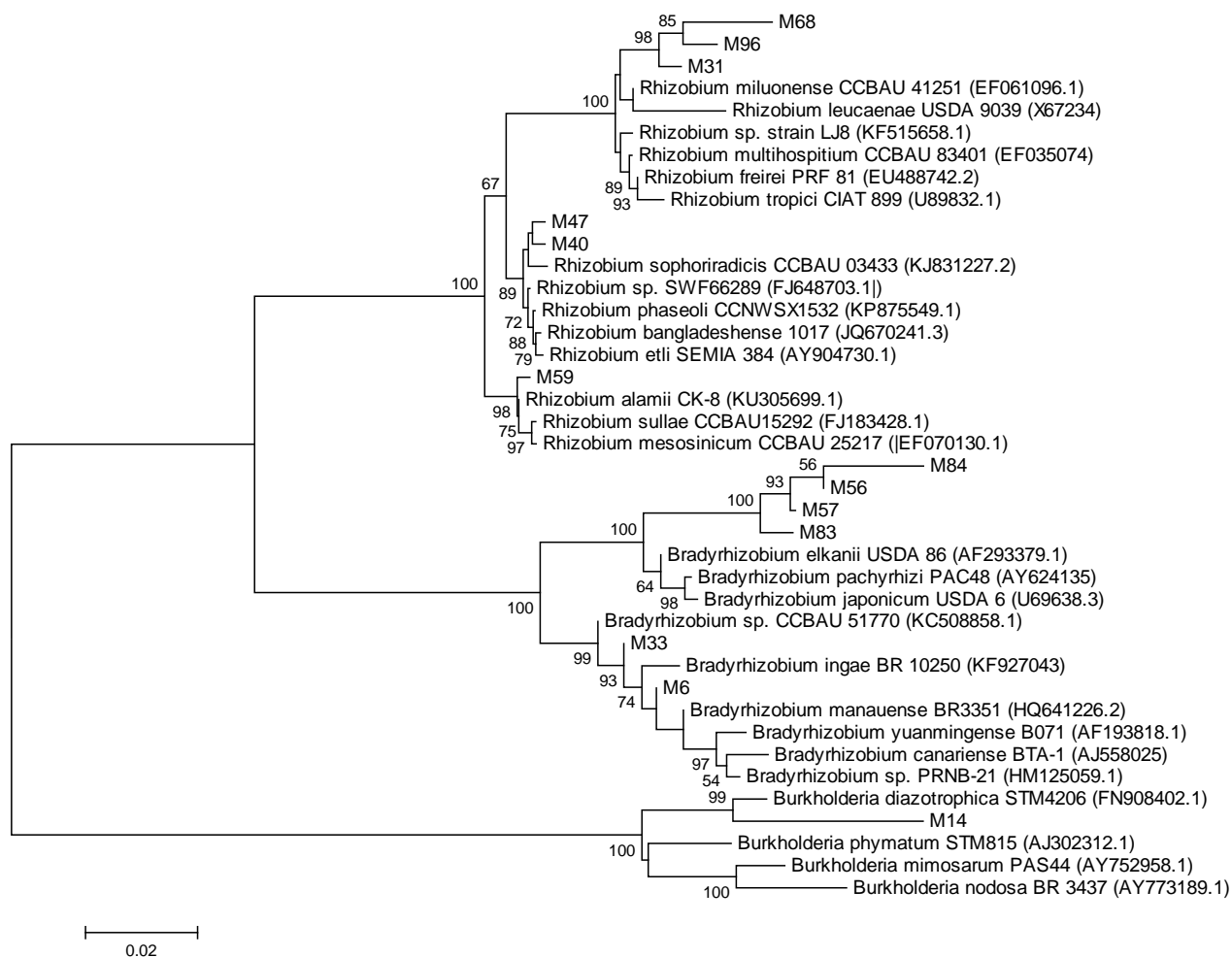
Os isolados M68, M96 e M31 apresentaram agrupamento com o grupo de *Rhizobium* que engloba as espécies *R. milouense*, *R. tropici* e *R. freirei*. Os isolados M47 e M40 apresentaram maior similaridade com outro grupo de *Rhizobium* filogeneticamente distinto que engloba *R. etli* e *R. phaseoli*, além das espécies recentemente descritas *R. sophoriradicis* e *R. bangladeshense*. O isolado M59 agrupou com outro grupo distinto de *Rhizobium*, junto às espécies *R. alamii*, *R. sulae* e *R. mesosinicum* (Figura 5).

Outros seis isolados apresentaram afinidade filogenética com o gênero *Bradyrhizobium* sendo que os isolados M33 e M6 se agruparam ao grupo de *Bradyrhizobium japonicum* enquanto as bactérias M84, M56, M57 e M83 foram mais próximas do grupo filogenético de *Bradyrhizobium elkanii*. O isolado M14 apresentou afinidade filogenética com o gênero *Burkholderia* sendo mais próximo da espécie nodulante *Burkholderia diazotrophica*.

Vale ressaltar que alguns dos isolados apresentaram similaridade muito baixa com as sequências depositadas no GenBank. Por exemplo, o isolado M14, apresentou apenas similaridade de 94% com a sequência de *Burkholderia diazotrophica* mais próxima. Da mesma forma, o isolado M68 e M84 apresentaram 97 e 96% de similaridade com as sequências mais próximas de *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium elkanii*, respectivamente. Essa baixa similaridade pode indicar que estes isolados podem pertencer a novas espécies de rizóbio, entretanto, o novo sequenciamento destes fragmentos se faz necessário para assegurar estes graus de similaridade.

Não foi possível observar uma preferência das estirpes de mulungu em nodular com um gênero de  $\alpha$ -rizóbio em detrimento há outro, o que geralmente é comum para leguminosas Papilionoidae, como por exemplo o feijoeiro comum e a (Grange et al., 2007) e a *Gliricida sepium* (Acosta-Durán e Martínez-Romero, 2002) que apresentam tendência a nodular com bactérias do gênero *Rhizobium*, e o feijão caupi e (Rufini et al., 2014) a Papilionoidae arbórea *Millettia pinnata* (Rasul et al, 2012; Arpiwi et al., 2013) que apresentam nodulação preferencial com *Bradyrhizobium*. Entretanto, a preferência destas espécies em nodular com  $\alpha$  em detrimento à  $\beta$ -rizóbios é clara, uma vez que dos 13 isolados identificados apenas um foi classificado como

pertencente ao gênero *Burkholderia* e os demais *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. A prevalência de nodulação das  $\alpha$ - protobactérias em detrimento ao grupo das  $\beta$  é claro em leguminosas Papilionoidae, já sendo observado anteriormente para leguminosas tropicais (Elliot et al., 2007).



**Figura 5.** Árvore filogenética construída a partir das sequências parciais do gene 16S rRNA dos 13 isolados bacterianos de mulungu e outras sequências de estirpes de rizóbio disponíveis no GenBank. O método de agrupamento utilizado foi o Neighbour-Joining com o algoritmo Jukes-Cantor. Os números nos nós da árvore representam os valores de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50%.

### 5.7 Eficiência simbiótica dos isolados de angico e mulungu em casa de vegetação

Os 18 isolados de nódulos de raízes do mulungu e 44 isolados do angico que tiveram amplificação positivas para ao menos um gene simbiótico foram testados em casa de vegetação, dos quais 22 isolados do angico (Tabela 7) e 10 isolados do mulungu (Tabela 8) foram capazes de renodular a espécie hospedeira de origem. Não se constatou ocorrência de nodulação nas testemunhas absolutas (livres de inoculação e adubação nitrogenada) e nas plantas com adubação nitrogenada, o que indica que não houve contaminação nos experimentos.

As plantas que foram inoculadas, mas não obtiveram a capacidade de nodular, não foram analisadas estatisticamente. Dentre os 7 isolados do mulungu que não foram capazes de nodular, 4 deles foram identificados como pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Tal acontecimento pode ser justificado pela instabilidade genética de alguns isolados, uma vez que os genes de codificação da nitrogenase (*nif*) e de nodulação (*nod*) são geralmente codificados em plasmídeos, como é o caso do *Rhizobium leguminosarum* que podem ser perdidos com o tempo ou até mesmo por problemas no instante do isolamento e estocagem no laboratório (Oliveira, 2009; Cauwenberghe et al., 2015; Moreira e Siqueira, 2006). Ou ainda pelo isolamento de organismos não simbiotes presentes na parte interna e externa dos nódulos radiculares que crescem mais rápido do que os rizóbio durante o processo de isolamento/purificação (JARAMILLO et al., 2013).

A maior média observada para número de nódulos (NN) dos isolados de angico foi atribuída para as plantas inoculadas com os isolados A67, A3, A27, A77 e A6 com 25, 13, 11, 11 e 8 nódulos por planta, respectivamente. Os outros isolados, apesar de ter nodulado não foram significativos quando comparados o NN a testemunha absoluta, livre de inoculação e adubação. Para a massa de nódulos secos (MNS), as plantas inoculadas não diferiram significativamente da testemunha absoluta e nitrogenada. Quando avaliadas os tratamentos que expressam o desenvolvimento vegetal, MPAS, MRS e N total, foi verificada uma diferença entre eles, onde todos os isolados apresentaram índices superiores a testemunha absoluta, que obteve os valores, 10 mg/planta, 40,9 mg/planta e 0,05 mgN/planta. Plantas inoculadas com os isolados A5, A27, A42, A64, A60, A67, A10, A55, A30, A38 e A6, possuíram os maiores índices de MPAS, variando entre 166,4 e 123,1 mg/planta não diferindo entre si, mas, diferindo significativamente dos isolados A63, A77, A18, A36, A8, A37, A84, A25, A14 e da planta nitrogenada, variando seus índices de 117,1 e 79,2 mg/planta. Os isolados A1 e A3, tiveram os menores valores, 21,9 e 40,3 mg/ planta, respectivamente, não diferindo significativamente da testemunha absoluta (Tabela 7). Para a variável MRS, todos os

isolados e a testemunha nitrogenada, apresentaram valores significativamente superior a testemunha absoluta.

O acúmulo de nitrogênio na parte aérea foi favorecido pela inoculação do isolado de angico, A27, com 7,27 mgN/planta. O acúmulo de N nos tratamentos A60, A30 e A67 (3,62, 3,18 e 2,61 mgN/planta, respectivamente) apresentaram valores intermediários, diferindo significativamente dos demais isolados, da testemunha e do controle nitrogenado.

**Tabela 7.** Produção de massa de parte aérea seca (MPAS), massa de raiz seca (MRS), massa de nódulos secos (MNS), número de nódulos (NN) e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N total) obtidos no ensaio de nodulação do angico.

Tratamentos	MPAS mg planta <sup>-1</sup>	MRS mg planta <sup>-1</sup>	MNS mg planta <sup>-1</sup>	NN nod planta <sup>-1</sup>	N total mgN planta <sup>-1</sup>
A1	21,9 c	270,6 a	1,8	4 b	0,32 d
A37	94,3 b	245,1 a	14,8	5 b	1,11 c
A38	124,6 a	197,8 a	6,7	4 b	1,59 c
A25	85,8 b	261,5 a	14,0	4 b	2,30 c
A63	117,1 b	284,4 a	0,7	1 b	1,58 c
A64	148,0 a	259,4 a	14,1	5 b	1,82 c
A67	142,8 a	269,1 a	33,5	25 a	2,61 b
A55	136,6 a	288,8 a	46,9	7 b	1,56 c
A6	123,1 a	228,8 a	4,3	8 a	1,46 c
A14	79,2 b	295,7 a	22,2	5 b	0,96 c
A5	166,4 a	280,4 a	1,7	1 b	2,10 c
A36	101,4 b	223,9 a	1,1	1 b	1,00 c
A84	88,2 b	177,1 a	8,0	1 b	1,08 c
A8	95,0 b	203,0 a	11,9	7 b	0,94 c
A60	147,8 a	162,4 a	19,8	6 b	3,62 b
A30	127,2 a	217,3 a	82,7	3 b	3,18 b
A27	155,2 a	355,5 a	24,4	11 a	7,27 a
A42	152,9 a	206,7 a	20,4	7 b	3,06 b
A10	142,2 a	248,7 a	6,8	3 b	1,18 c
A3	40,3 c	109,3 a	6,3	13 a	0,33 d
A77	112,9 b	274,0 a	18,4	11 a	1,50 c
A18	105,9 b	216,8 a	8,8	4 b	2,12 c
TEST ABS	10,0 c	40,9 b	0,0	0 b	0,05 d
TEST N	87,3 b	177,0 a	0,0	0 b	1,71 c

\*\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma variável não diferem pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade

Para os isolados de mulungu, a maior média observada para o NN foram atribuída para as plantas inoculadas com a estirpe de referência BR5609, com 31 nódulos/planta. Houve uma variação no NN, sendo que, os isolados M34 e M32, foram após a referências, os isolados que mais nodularam significativamente, seguidos pelos outros isolados. Ao avaliar a variável MNS, apenas os isolados M6 e M40 não diferiram significativamente das testemunhas absolutas e nitrogenadas, os outros isolados variaram o peso entre 105,75 (referência) a 28,40 mg planta<sup>-1</sup> (M44). Quando avaliadas as variáveis que expressam o desenvolvimento vegetal, MPAS, MRS e N total, foi verificado para as variáveis MPAS e MRS, uma similaridade entre todos os tratamentos, não diferindo significativamente entre os isolados e as testemunhas. A capacidade dos isolados M31 e M14 de acumular quantidades de N em sua parte aérea, foram significativamente iguais quando comparadas a testemunha nitrogenada e estirpe de referência (Tabela 8).

Ao avaliarem a eficiência de bactérias presentes em nódulos de duas espécies de Lotus. Gossmann et al (2012), notaram que quando houve reinoculação em uma das espécies, *L. pedunculatus*, todos os seus isolados foram capazes de formar nódulos, enquanto 6 dos 23 isolados de *L. corniculatus* não possuíram a capacidade de renodular a espécie de origem. Eles justificaram esse resultado com a possibilidade de estirpes da rizosfera não nodulantes terem sido isolados, apesar de uma prévia esterilização superficial dos nódulos antes do isolamento.

Tal como no presente estudo, Costa et al., (2013) constatou em um estudo realizado com feijão-caupi a presença de estirpes que são capazes de fixar nitrogênio e formar nódulos. Kawaka et al., (2014) comprovaram que a inoculação de estirpes de rizóbio nativos em solos do Quênia Ocidental aumentou significativamente a produção de massa seca e da concentração de nitrogênio presente na parte aérea em feijão-comum, quando comparadas ao controle nitrogenado.

Para a implementação da tecnologia de inoculação de rizóbio em leguminosas, existe a necessidade de se verificar a compatibilidade e eficiência simbiótica dos mesmos (Moreira e Siqueira, 2006). A princípio é importante a realização de ensaios em condições controladas que verifiquem a capacidade de nodulação, efeitos no crescimento e quantidade de nitrogênio fixada via simbiose, tais fatores constituem importantes parâmetros no processo de seleção de estirpes e na recomendação de inoculantes. Neste sentido, o presente estudo constatou que para espécies de angico, o isolado A27, e para espécie de mulungu os isolados M31 (*Rhizobium*) e M14 (*Burkholderia*), quando comparados aos outros isolados inoculados, a testemunha absoluta e a



testemunha nitrogenada, apresentaram alta capacidade de fixação do nitrogênio em simbiose com seu hospedeiro de origem.

**Tabela 8.** Produção de massa de parte aérea seca (MPAS), massa de raiz seca (MRS), massa de nódulos secos (MNS), número de nódulos (NN), Teor de nitrogênio na parte aérea e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N total) obtidos no ensaio de nodulação do mulungu.

Tratamento	Gênero	MPAS	MRS	NN	MNS	N total
		g planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	mg N planta <sup>-1</sup>
M14	<i>Burkholderia</i>	1,96	1,34	5 d**	35,70 c	72,32 a
M31	<i>Rhizobium</i>	1,87	1,89	10 c	44,65 c	61,53 a
M33	<i>Bradyrhizobium</i>	1,05	1,29	6 d	37,90 c	18,12 b
M34	Nd*	1,52	1,12	20 b	67,15 b	37,37 b
M40	<i>Rhizobium</i>	0,84	1,18	4 d	21,85 d	18,42 b
M44	<i>Rhizobium</i>	1,58	1,29	4 d	28,40 c	25,46 b
M6	<i>Bradyrhizobium</i>	1,40	1,82	9 c	12,50 d	27,12 b
M82	Nd*	1,61	1,61	19 b	76,70 b	25,66 b
M83	<i>Bradyrhizobium</i>	0,90	1,33	14 c	48,43c	24,55 b
M84	<i>Bradyrhizobium</i>	1,07	1,16	12 c	50,47c	31,09 b
BR5609	<i>Bradyrhizobium</i>	2,22	1,30	31 a	105,75 a	48,26 a
TEST N	-	0,98	1,82	0 e	0,00 d	49,32 a
TEST ABS	-	1,03	1,60	0 e	0,00 d	22,68 b
CV (%)		38,6	47,8	19,9	42,9	21,8

\* Não determinado; \*\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma variável não diferem pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade

## 6. CONCLUSÕES

As espécies de plantas nativas da caatinga *Mimosa tenuiflora* Poir., *Anadenanthera colubrina* Vellozo e *Erythrina velutina* Willd., quando utilizadas como plantas iscas em solos de Caatinga densa e Caatinga aberta, são noduladas por uma grande diversidade de rizóbios.

Bactérias isoladas em solos de Caatinga densa e aberta são capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono e de tolerar altas temperaturas e altas concentrações de NaCl.

A capacidade de produzir compostos indólicos nas estirpes M34, M84, M59, M47, M57, A42 e J128 demonstram o potencial dessas estirpes em promover crescimento vegetal.

O aporte de nitrogênio encontrado na parte aérea das plantas inoculadas com os isolados A27 em plantas de angico e M31 e M14 em plantas de mulungu representam uma proposta interessante na indicação de estirpes eficientes para a produção de mudas e estabelecimento dessas plantas em campo, nos solos avaliados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- de ALBUQUERQUE, H.C.; PEGORARO, R.F.; VIEIRA, N.M.B.; de JESUS FERREIRA AMORIM, I.; KONDO, M.K. Capacidade nodulatória e características agronômicas de feijoeiro-comum submetidos à adubação molíbdica parcelada e nitrogenada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 214-221, 2012.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v.215, p. 403–410. 1990.
- ALVES, J.J.A.; ARAÚJO, M.A.; NASCIMENTO, S.S. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Caminhos de Geografia**, v. 9, n. 27. p. 143 – 155. 2008.
- ANGUS, A.A.; LEE, A.; LUM, M.R.; SHEHAYEB, M.; HESSABI, R.; FUJISHIGE, N.A.; YERRAPRAGADA, S.; KANO, S.; SONG, N.; YANG, P.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; FARIA, S.M.; DAKORA, F.D.; WEINSTOCK, G.; HIRSCH, A. M. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteo-bacterium, are influenced by environmental factors. **Plant Soil**, v.369, p.543–562. 2013.
- ALVES, J.J.A.; ARAÚJO, M.A.; NASCIMENTO, S.S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Caatinga**, v.22, p.126-135, 2009.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Academia Brasileira de Ciências**, v.56, p.265. 1984.

- BÉLANGER, G.; CASTONGUAY, Y.; BERTRAND, A.; DHONT, C.; ROCHETTE, P.; COUTURE, L. Winter damage to perennial forage crops in eastern Canada: causes, mitigation, and prediction. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 1, p. 33-47. 2006.
- BERGE, O.; LODHI, A.; BRANDELET, G.; SANTAELLA, C.; RONCATO, M.A.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. *Rhizobium alamii* sp. nov., na exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 59, p. 367–372. 2009.
- BOIERO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n.4, p. 874-880. 2007.
- BONTEMPS, C.; ROGEL, M.A.; WIECHMANN, A.; MUSSABEKOVA, A.; MOODY, S.; SIMON, M.F.; JAMES, E.K. Endemic Mimosa species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **The New Phytologist**, v. 209, n. 1, p. 319–333. 2016.
- BOUKHATEM, Z.F.; DOMERGUE, O.; BEKKI, A.; MERABET, C.; SEKKOUR, S.; BOUAZZA, F.; GALIANA, A. Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 534–547. 2012.
- BOURNAUD, C.; DE FARIA, S.M.; DOS SANTOS, J.M.F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL, C.; GROSS, E.; JAMES, E.K.; PRIN, Y.; MOULIN, L. *Burkholderia* Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the *Piptadenia* Group (Tribe Mimoseae). **PLoS One**, v. 8, e63478. 2013.
- CHMIELEWSKI, F-M.; MÜLLER, A.; BRUNS, E. Climate change and trends in phenology of fruit trees and field crops in Germany. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 121, p. 69–78. 2004.
- BOYD, E.S.; PETERS, J.W. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. **Front Microbiol**, v. 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00201. 2013.
- BRASIL. Lei n. 12.651, de 25 de maio de 2012. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2011-2014/2012/Lei/L12651.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12651.htm)>. Acesso em 09 de Julho de 2015.
- CAMPANHA, M.M. Árvores e arbustos do sistema agrossilvipastoril Caprinos e Ovinos. **Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos**, 32 p. 2010.
- CARVALHO, P.E.R. Angico-Branco. **Colombo: Embrapa florestas**, Circular técnica: 56, 10p. 2002.

- CARVALHO, P.E.R. Mulungu (*Erythrina velutina*). **Colombo: Embrapa florestas**, Circular técnica: 160, 8p. 2008.
- CHAGAS JÚNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v.39, n.2, p.467 – 470, 2009.
- CHAGAS, A.F.; DE OLIVEIRA, L.A.; DE OLIVEIRA, A.N. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n.1, p. 161–169. 2010.
- CORDERO, I.; RUIZ-DÍEZ, B.; COBA DE LA PEÑA, T.; BALAGUER, L.; LUCAS, M.M.; RINCÓN, A.; PUEYO, J.J. Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of *Vachellia macracantha*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 96. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.01.011>. 2016.
- COSTA, T.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SALES, M.F. Root and shoot biomasses in the tropical dry forest of semi-arid Northeast Brazil, p.113–123. <http://doi.org/10.1007/s11104-013-2009-1>. 2014.
- CUNHA, T.J.F.; SÁ, I.B.; OLIVEIRA NETO, M.B de.; TAURA, T.A.; ARAÚJO FILHO, J.C.; GIONGO, V.; SILVA, M.S.L.DA.; DRUMOND, M.A. Uso Atual e Quantificação de Áreas Degradadas na Margem Direita do Rio São Francisco no Município de Curaçá-BA. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p.1197-1212. 2011.
- CUNHA, J.B. de A.; NUNES, I.A.; GAVA, C.A.T.; SANTOS, R.C.; MARTINS, L.M.V.; FERNANDES JUNIOR, P.I. Diversidade cultural de bactérias isoladas de nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) cultivados em solos do Nordeste do Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, Florianópolis – SC**. Anais: ISBN 978-85-85014-71-1. SBCS, 2013.
- ELLIOTT, G.N.; CHEN, W.M.; CHOU J.H.; WANG. H.C.; SHEU. S.Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN. L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa spp.* and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, v. 173, p. 168–180. 2007.
- EADY, R.R. Structure–function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Society**, v.96, p.3013–3030. 1996.
- FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S. B.; SANTOS, C.E.R.S.; FERNANDES, A.R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid caatinga. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 3, p. 344–349. 2010.
- FREITAS, A.D.S.; BORGES, W.L.; ANDRADE, M.M.M.; SAMPAIO, E.V.S. B.; SANTOS, C.E.R.S.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; MULATO, B.M.; LYRA, M.C.C.P. Characteristics of

nodule bacteria from *Mimosa spp* grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 788-796. 2014.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.

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

FERNANDES JUNIOR, P.I.; LIMA, A.A.; PASSOS, S.R.; GAVA, C.A.T.; OLIVEIRA, J.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1604-1612, 2012b.

FERNANDES JÚNIOR, P.I.; MORGANTE, C.V.; GAVA, C.A.T.; ANTONIO, C.; SANTOS, F. Duplex pcr para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. Petrolina: **Embrapa Semiárido**. Comunicado Técnico, 6p. 2013.

GABY, J.C.; D.H. BUCKLEY. A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. **Database, Oxford Express**, v. 2014, p. 1-8. 2014.

GALVÃO, P.G. URQUIAGA, S.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I. Interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 63p. 2010.

GARAU, G.; YATES, R.J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J.G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 125-134. 2009

GHOSH, P.K.; KUMAR DE, T.; MAITI, T.K. Production and metabolism of indole acetic acid in root nodules and symbiont (*Rhizobium undicola*) isolated from root nodule of aquatic medicinal legume *Neptunia oleracea* Lour. **Journal of Botany**, <http://doi.org/10.1155/2015/575067>, 2015.

GUIMARÃES, A.A.; FLORENTINO, L.A.; ALVES ALMEIDA, K.; LEBBE, L.; BARROSO SILVA, K.; WILLEMS, A.; DE SOUZA MOREIRA, F.M. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 433–441. 2015.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A.M.; MOULIN, L.; CHEN, W.M.; ELLIOTT, G.N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA, D.E.; LOS SANTOS, P.; GROSS, E.; dos REIS JUNIOR, F.B.;

- SPRENT, J.I.; et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range and future prospects. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 24, p. 1276–1288. 2011.
- HALDER, A.K.; CHAKRABARTY, P.K.; Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium Folia*. **Microbiologia**, v. 38, p. 325-330. 1991.
- HALDO-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. **Cambridge Journal of Microbiology**, v. 49, p. 781-787, 2003.
- 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. 9, 2001. Disponível em: <[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)> Acesso em: 12 dez. 2015.
- HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant soil**, v. 311, p. 1–18. 2008.
- HAYAT, S.R.; ALI, U.; AMARA, R.; KHALID, I. Ahmed Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Ann Microbiol**, v. 60, p. 579–598. 2010.
- HOWARD, J.B.; KECHRIS, K.J.; REES, D.C.; GLAZER, A.N. Multiple Amino Acid Sequence Alignment Nitrogenase Component. **Insights into Phylogenetics and Structure- Function Relationships**, v. 8(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0072751>. 2013.
- HOWIESON, J.G.; DE MEYER, S.E.; VIVAS-MARFISI, A.; RATNAYAKE, S.; ARDLEY, J.K.; YATES, R.J. Novel Burkholderia bacteria isolated from *Lebeckia ambigua* - A perennial suffrutescent legume of the fynbos. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 60, p. 55-64. 2013.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, J.R.; MENDES, L.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa soja, 48p. (Embrapa soja. Circular Técnica, 35). 2001.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J.Z.; SIBALDELLI, R.N.R.; MENDES, I.C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 927-939. 2006.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413-425. 2010.
- HUNGRIA, M.; KASCHUK, G. Regulation of N<sub>2</sub> fixation and NO<sub>3</sub> – /NH<sub>4</sub> + assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. In: SULIEMAN, S.; TRAN, L-S. P. **Legume Nitrogen Fixation in a Changing Environment**. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-06212-9>. 2015.

- INDRASUMUNAR, A.; DART, P.J.; MENZIES, N.W. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* in acid soils can be predicted from their sensitivity to acid soil stress factors in acidic agar media. **Soil Biol Biochem**, v. 43, p.2046-52. 2011.
- IPCC. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, edited by T. F. Stocker, D. Qin, G. -K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, P. M. Midgley, Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K. 2013.
- KAUR, G.; SINGH, B.P.; NAGPAL, A.K. Phenology of Some Phanerogams (Trees and Shrubs) of Northwestern Punjab, India. **Journal of Botany**, v. 2013, 10p. 2013.
- KUCUK, C.; KIVANC, M.; KINACI, E. Characterization of *Rhizobium* Sp. Isolated from Bean. **Turkish Journal of Biology**, v. 30, p. 128-129. 2006.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas, **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459–1465. 2007.
- LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v.147, n.4, p.981-993, 2001.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M-R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 56–63. 1994.
- LEAL, I.R.; SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; LACHER, T.E. Changing the course of biodiversity conservation in the caatinga of northeastern Brazil. **Conservation Biology**, v.19, p.701-706. 2005.
- LEITE, J.; SEIDO, S.L.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea Cultivars in soils of the lower half of the São Francisco river valley. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 33, p. 1215-1226, 2009.
- LIMA, K.D.R.; CHAER, G.M.; ROWS, J.R.C.; MENDONCA, V.; RESENDE, A.S. Seleção de espécies arbóreas para revegetação de áreas degradadas por mineração de picarra na Caatinga. **Caatinga**, v. 28, p. 203-213. 2015.
- LIMA, H.C.; de, QUEIROZ, L.P.; MORIM, M.P.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V. **Fabaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 20 Nov. 2014.



- LIRA JUNIOR, M.A. Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. **Frontiers in Microbiology**, v. 6. 2015.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.
- LU, J.K.; DOU, Y.J.; ZHU, Y.J.; WANG, S.K.; SUI, X.H.; KANG, L.H. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1900–1905. 2014.
- 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, n. 1, p. 289-307. 2012.
- MARINHO, R.C.N.; NÓBREGA, R.S.A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 395- 402. 2014.
- MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B. RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: A strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biol Fert. Soils**, v. 38, p. 333-339, 2003.
- MARTINS, P.G.S.; JUNIOR, M.A.L.; FRACETTO, G.G.M.; DA SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R.P.; DE LYRA, M. DO C.C.P. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, v. 197, p. 459–469. 2015.
- MARTINS, L.M.V. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”. **Comunicado Técnico: Embrapa**, n.19, 14p. 1997.
- MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; BÉNA, G.; TISSEYRE, P.; CHAINTREUIL, C.; HEULIN, K.; LAGUERRE, G. The geographical patterns of symbiont diversity in the invasive legume *Mimosa pudica* can be explained by the competitiveness of its symbionts and by the host genotype. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2099–2111. 2014.
- MENEZES, K.A.S.; NUNES, G.F.O.; SAMPAIO, A.A.; SILVA, A.F.; SOUZA, L.S.B.; GAVA, C.A.T.; MARTINS, L.M.V.; FERNANDES-JUNIOR, P.I. Diversity of new root nodule bacteria from *Erythrina velutina* Willd., a native legume from the dry forest Caatinga (Northeastern, Brazil). **Rev Ci Agr**, 39. doi:10.19084/RCA15050. 2016.
- MENZEL, A.; FABIAN, P. Growing season extended in Europe. **Nature**, v. 397, p. 659. 1990.

- de MEYER, S.E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J.K.; VAN WYK, B.E.; VANDAMME, P.A.; HOWIESON, J. G. *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1090–1095. 2014.
- de MEYER, S.E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J.K.; TRENGOVE, R.D.; GARAU, G.; HOWIESON, J.G.; VANDAMME, P. *Burkholderia rhynchosiae* sp. nov., isolated from *Rhynchosia ferulifolia* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3944–3949. 2013.
- MICHELIS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1206–1212. 1994.
- MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas. In: MOREIRA, F. M.S.; SIQUEIRA, J.O., BRUSSAARD, L. (eds) Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros, edn. Ufla, Lavras, p 621–680. 2008.
- MOREIRA, F.M.M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da UFLA, 726p. 2006.
- MOTHAPO, N.; GROSSMAN, J.M.; MAUL, J. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch genotypes, **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 201–213, 2013.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948–950, 2001.
- NOGUEIRA, N.O.; OLIVEIRA, O.M. de.; MARTINS, C.A.DA S.; BERNARDES, C. DE O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.8, n.14, p.2121. 2012.
- NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume Bacteriology. In: SHAM, N.H.; BRYAN, W.W. (ed). Tropical Pasture Research – Principles and Methods. Hurley: common wealt bureau of pastures and field crops. p. 134–174. (bulletin, 51). 1976.
- OLDROYD G.E.D.; DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Current Opinion in Biotechnology**, v.26, p.19–24. 2014.
- OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **Euro J Soil Biol**, v. 45, p. 106–113. 2009.
- OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in diferente soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant Soil**, v. 284, p.23–32. 2006.

- OLIVEIRA-LONGATTI, S.M. DE.; MARRA, L.M.; MOREIRA, F.M.D.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, n. 11, p. 948–959. 2013.
- ORMEÑO-ORRILLO. E.; SERVÍN-GARCIDUEÑAS, L.E.; ROGEL, M.A.; GONZÁLEZ, V.; PERALTA, H.; MORA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 287–291. 2015.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Can. J. Microbiol**, v. 42, p. 207-20. 1996.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, J.E. Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.34, p.17-42. 2015.
- POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v.152, n.3, p.95-103, 2001.
- QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 467p. 2009.
- QUEIROZ, M.A. Recursos Genéticos Vegetais da Caatinga para o Desenvolvimento do Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.6, p.1135-1150. 2011.
- RADL, V.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; LEITE, J.; PASSOS, S.R.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 725–730. 2014.
- RAMÍREZ, C.A.; KLOEPPER, J.W. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, p. 835–844. 2010.
- REJILI, M.; MAHDHI, M.; FTERICH, A.; DHAOUI, S.; GUEFRACHI, I.; ABDEDDAYEM, R.; MARS, M. Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in Tunisia: soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 157, p. 60–69. 2012.
- dos REIS JUNIOR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W-M.; NORÉN, A.; RUBIO, M.C.; de FARIA, S.M.; BONTEMPS, C.; GOI, S.R.; YOUNG, J.P.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K.

- Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 934-946. 2010.
- RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J.L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1271–1275. 2004.
- RIVAS, R.; MARTENS, M.; DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Syst Appl Microbiol**, v. 32, p. 101–110. 2009.
- RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P. Fixação Biológica de Nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; SILVA, P.H.S.; VIANA, F.M.P. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. p. 281-335, 2005.
- SAÏDI, S.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; SANTILLANA, N.; ZÍÑIGA, D.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, E.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 242–247. 2014.
- SAHASRABUDHE, M.M. Screening of rhizobia for indole acetic acid production. **Ann. Biol. Res.** v. 2, p. 460-468. 2011.
- SAMPAIO, E.V.S.B. Overview of the Brazilian caatinga. In: BULLOCK, S.H.; MOONEY, H.A.; MEDINA, E. (Eds.). Seasonally dry tropical forests. **Cambridge University Press**, p.35-63. 1995.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, p. 743–767. 2013.
- SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G.; BORGES, W.L.; BEZERRA, R.V.; FREITAS, A.D.S. Diversidade de rizóbio capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.
- SANTOS, C.E.R.S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**, Guaíba: Agrolivros, p. 97-118. 2008.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J.; Determination of bacterially derived auxin using microplate method. **Lett Appl Microbiol**, v. 20, p. 282–285. 1995.
- SASIREKHA, B.; SHIVAKUMAR, S.; SULLIA, S.B. Statistical optimization for improved indole-3-acetic acid (iaa) production by *Pseudomonas aeruginosa* and demonstration of enhanced plant growth promotion. **J. Soil Sci. Plant Nutr**, v. 12, p. 863-873. 2012.
- SHETTA, N.D.; AL-SHAHARANI, T.S.; ABDEL-AAL, M. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. **Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci**, v. 10, p. 410-418. 2011.

- SHEU, S.Y.; CHOU, J.H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; GROSS, E.; DOS REIS JUNIOR, F.B.; CHEN, W. M. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 435–441. 2013.
- SHEU, S Y.; HUANG, H.W.; YOUNG, C.C.; CHEN, W.M. *Rhizobium alvei* sp. Nov., isolated from a freshwater river. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, n. 2, p. 472–478. 2015.
- da SILVA, K.; FLORENTINO, L.A.; DA SILVA, K.B.; DE BRANDT, E.; VANDAMME, P.; DE SOUZA MOREIRA, F.M. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 175–82. 2012.
- SINGH, O.; GUPTA, M.; MITTAL, V.; KIRAN, S.; NAYYAR, H.; GULATI, A.; TEWARI, R. Novel phosphate solubilizing bacteria “*Pantoea cypripedii* PS1” along with *Enterobacter aerogenes* PS16 and *Rhizobium ciceri* enhance the growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Growth Regulation**, v. 73, n. 1, p. 79–89. 2014.
- SOARES, V.O.; ALMEIDA, M.O. O bioma Caatinga sob a percepção da paisagem e a dinâmica da agricultura. **Revista Geográfica de América Central**, Número Especial EGAL. p. 115. 2011.
- de SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401–419. 2015.
- STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiossantes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1107–1120. 2008.
- ST.CLAIR, S. B.; LYNCH, J.P.; The opening of Pandora’s box: climate change impacts on soil fertility and crop nutrition in developing countries. **Plant and Soil**, v. 335, p. 101-115. 2010.
- SYLVESTER- BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Quantitative survey of phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of grasses and legumes in the Amazon. **Acta Amazonica**, v.12, p.15- 22, 1982.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p.2725–2729. 2013.
- TAULÉ, C.; ZABALETA, M.; MAREQUE, C.; PLATERO, R.; SANJURJO, L.; SICARDI, M.; FRIONI, L.; BATTISTONI, F.; FABIANO, E. New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1692-1700. 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918p. 2013.

- TEIXEIRA, F.C.P.; REINERT, F.; RUMJANEK, N.G; BODDEY, R.M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the <sup>15</sup>N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1989-1993, 2006.
- TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 201-208, 2010.
- TORRES-JÚNIOR, C.V.; LEITE, J.; SANTOS, C.E.R.S.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Diversity and symbiotic performance of peanut rhizobia from Southeast region of Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 566-577. 2014.
- TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p.117-126, 2006.
- TSEGAYE, D.; ASSEFA, F.; GEBREKIDAN, H.; KENENI, G. Nutritional, eco-physiological and symbiotic characteristics of rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) collected from acidic soils of Ethiopia. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 7, p. 646–654. 2015.
- VALVERDE, A.; IGUAL, J.M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 2631–2637. 2006.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p. 507-512. 2002.
- VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C.E.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, v. 33, n. 5, p. 1227–1235. 2009.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, **Blackwell Scientific**. 164p. 1970.

- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**, v. 173, p. 697–703. 1991.
- XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; CRISTINA, M.; NEVES, P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e a temperatura em condição in vitro. **Caatinga**, p. 1–9. 2007.
- WOESE, C. Prokaryote Systematics: Chapter 1. The Evolution of a Science. In: The prokaryotes. In: BALOWS, A. et al. (Ed.). The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications. 2.ed. New York: **Springer**. v.1, p.3-18. 1991.
- YADAV, J.; VERMA, J.P.; JAISWAL, D.K.; KUMAR, A. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). **Ecological Engineering**, v. 62, p. 123–128. 2014.
- ZAKHAROVA, E.A.; SHCHERBAKOV, A.A.; BRUDNIK, V.V.; SKRIPKO, N.G.; BULKHIN, N.S.; IGNATOV, V.V. Biosynthesis of indol-3-acetic acid in *Azospirillum brasiliense*: insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, p. 572-576, 1999.
- ZILLI, J.E.; BARAÚNA, A.C.; DA SILVA, K.; DE MEYER, S.E.; FARIAS, E.N.C.; KAMINSKI, P.E.; O'HARA, G. *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3950–3957. 2014.